

Vulnerabilidade e Resiliência ao Estresse

Aspectos ontogenéticos das consequências comportamentais, neuroendócrinas e neuroquímicas

*Tese apresentada à Escola Paulista de Medicina - Universidade
Federal de São Paulo como requisito parcial para obtenção do
Título de Livre Docente pelo Departamento de Psicobiologia,
Disciplina de Psicofarmacologia*

São Paulo

2013

Suchecki, Deborah

Vulnerabilidade e Resiliência ao Estresse: Aspectos ontogenéticos das consequências comportamentais, neuroendócrinas e neuroquímicas –

Deborah Suchecki, São Paulo, 2013

Tese de Livre Docência – Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina.

Departamento de Psicobiologia. Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia.

Título em Inglês: Vulnerability and Resilience to Stress: Ontogenetic aspects of the behavioural, neuroendocrine and neurochemical outcomes.

1. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis; 2. Corticosterone; 3. Maternal deprivation; 4. REM sleep deprivation; 5. Emotional behaviour; 6. Animal models.

Agradecimentos

Nada sou além de um elo entre os que me precederam e os que me sucederão. Nada saberia se não fosse por meus professores e de nada valeria meu saber se não fosse por meus estudantes. Meus professores são meus exemplos; meus estudantes, minha motivação. Vocês dão sentido à minha carreira.

Ao Prof. Sergio Tufik, obrigada por sua generosidade que impulsionou minha carreira. Sem essa primeira oportunidade, seria muito difícil chegar até aqui.

Aos meus amigos e colegas do Departamento de Psicobiologia. Somos companheiros nessa empreitada de fazer do nosso Departamento uma referência de excelência em ensino e pesquisa. Obrigada pelo trabalho conjunto.

Às secretárias que vêm nos auxiliando com boa vontade e alegria: Erika Damião, Jacqueline Wetzel, Mara Vianna Carvalho, Nereide Lourdes Garcia, Rosana Campos e Valéria da Hora Acquilino.

Ao Julio César Nascimento, pois sua disposição em colaborar com todos os aspectos necessários para o bom andamento do Departamento de Psicobiologia é um exemplo a ser seguido.

À Maria Cristina Jorge, por toda assessoria em cada detalhe na construção do conhecimento.

Aos colegas externos ao Departamento de Psicobiologia, que tiveram a generosidade de me convidar e de aceitar meus convites para colaborações científicas: Alessandra Mussi Ribeiro, Anete Cute Ferraz, Clement Harmani, Frida Zaladek Gil, Jacqueline Luz, Jair de Jesus Mari, Luciene Covolan, Marcelo Feijó de Mello, Paula Ayako Tiba, Regina Helena Silva, Rita Sinigaglia-Coimbra, Ruth Guinsburg, Tatiana de Lima Ferreira e Vanessa Costhek Abílio. É muito bom trabalhar com vocês!

Às agências de fomento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro em todos esses anos.

Aos fundadores da Associação Fundo de Incentivo à Pesquisa, por terem construído uma instituição que nos permite ter uma estrutura invejável.

A quem tiver interesse de ler este material, acredite! Esta tese foi escrita com muito carinho. Espero que seja útil!

Agradecimentos especiais

À minha amiga e companheira de Chefia, Lia Rita Bittencourt, por sua alegria e apoio constantes.

Aos colegas da Disciplina e da Área de Concentração de Psicofarmacologia, Isabel Marian Hartmann de Quadros, Jair Chagas Ribeiro, Ricardo Borges Machado e Vânia D'Almeida, é muito bom trocar ideias com vocês!

Ao Marcos Vinicius Bunscheit, meu braço direito na organização do GENED (Grupo de Estudos da Neurobiologia do Estresse e suas Desordens). Obrigada pelo empenho e lealdade.

À Valéria da Hora Acquilino, por todo auxílio, carinho e disponibilidade. Sua ajuda foi essencial para a manutenção da minha sanidade mental.

Aos meus colegas que me acompanharam ou acompanham na co-orientação de meus estudantes agradeço profundamente: Beatriz Duarte Palma Xylaras, Beatriz Helena Pizarro De Lorenzo, Carlos Eduardo Neves Girardi, Isabel Marian Hartmann de Quadros, José Carlos Galduróz, Maria Gabriela Menezes de Oliveira, Paula Ayako Tiba, Ricardo Borges Machado e Viviane L. A. Nouailhetas.

Aos meus amigos não-acadêmicos, Déborah Rossi, Karin Riske, Márcia Hentschel e Munir Sabag, pelos inumeráveis momentos de diversão em nossas viagens inesquecíveis, pela amizade e companheirismo de tantos anos.

Às minhas amigas acadêmicas Bel, Paulinha, Vânia, Rosana, Vanessa, Carol, Dani, Grazie, Lyvia, Pamela e Vivi por todos os momentos não-acadêmicos. Vocês são diversão garantida!

Ao Cadu, Lyvia e Paula Tiba pela leitura crítica dessa tese, obrigada por apontar os erros e acertos desse texto.

Dedicatória

Infelizmente nenhum dos dois está presente fisicamente para compartilhar esse momento comigo. Mas sei que o Sr. Adam e dona Anita estão cheios de orgulho. Afinal, ambos acreditavam no poder da Educação e da Cultura e não pouparam esforços para pavimentar o caminho que me trouxe até este momento.

Meu orgulho por ser sua filha e minha gratidão por tudo o que fizeram por mim são incomensuráveis.

Marcos Suchecki, meu primeiro e mais antigo amigo. O que mais é preciso dizer?

Minha família é, numericamente, muito pequena, mas nossa união e amor nos torna grandes e fortes. Anninha, Tio Julio, Tia Sofia, Dani, Ingrid e Nathan, sempre juntos!

Resumo

Esta tese de Livre Docência aborda um assunto atual e frequentemente presente no cotidiano humano, o Estresse. Por meio de uma revisão aprofundada da literatura pertinente, pretende-se apresentar os aspectos biológicos da resposta hormonal e comportamental a estímulos estressores ao longo da vida, com ênfase em resultados publicados pela candidata. Os estudos completos, porém ainda não publicados estão apresentados e discutidos neste trabalho. Os achados mostram que as consequências de estímulos estressores dependem de características do estímulo e de características do indivíduo. O recrutamento dos sistemas de resposta ao estresse tem a finalidade de dar subsídio para o comportamento necessário em determinada situação. Porém, para que seja classificado como estressor, o estímulo deve ser incontrolável e imprevisível. Quanto às características do indivíduo, as estratégias de enfrentamento são fundamentais e podem determinar, em associação com a história prévia, o sucesso ou fracasso em lidar com situações adversas, especialmente se forem persistentes.

Abstract

This Full Professorship thesis portrays a current and frequently present matter in human daily life, Stress. By means of a broad literature overview, I intend to present the biological foundation of the hormonal and behavioural responses to stressful stimuli throughout life span, with an emphasis in my work. The complete, yet unpublished studies are presented and discussed in the present document. The findings show that outcomes of stressful events depend on the stimulus features and on individual characteristics. Therefore, recruitment of the response systems has the purpose of giving support to necessary and appropriate behaviours for a given situation. However, to be perceived as a stressor, the stimulus must be uncontrollable and unpredictable. As for the individual, coping strategies are of utmost importance and may determine, together with one's previous history, the success or failure to deal with adverse situations, especially when they are prolonged.

Índice

1. Introdução	1
2. Estresse: A incansável busca por uma definição	4
3. Os sistemas de Resposta ao Estresse: Ontogênese e Diferenças sexuais	17
4. O Estresse Perinatal e suas Consequências	49
5. Privação de Sono REM: Uma nova modalidade de estressor?	82
6. Considerações finais e Perspectivas futuras	122
7. Referências	124

Publicações incluídas nessa Tese de Livre Docência

1. Barbosa Neto JB, Tiba PA, Faturi CB, de Castro-Neto EF, da Graça Naffah-Mazacoratti M, de Jesus Mari J, de Mello MF, Suchecki D. Stress during development alters anxiety-like behavior and hippocampal neurotransmission in male and female rats. *Neuropharmacology* 2012; 62: 518-526.
2. Bittencourt LR, Suchecki D, Tufik S, Peres C, Togeiro SM, Bagnato MC, Nery LE. The variability of the apnoea-hypopnoea index. *J Sleep Res* 2001; 10: 245-251.
3. Borsonelo EC, Suchecki D, Calil HM, Galduróz JC. Supplementation with fish oil and coconut fat prevents prenatal stress-induced changes in early postnatal development. *Int J Dev Neurosci* 2011; 29: 521-527.
4. Borsonelo EC, Suchecki D, Galduróz JC. Effect of fish oil and coconut fat supplementation on depressive-type behavior and corticosterone levels of prenatally stressed male rats. *Brain Res.* 2011; 1385: 144-150.
5. Carvalhaes-Neto N, Ramos LR, Suchecki D, Tufik S, Huayllas MK, Kater CE. The effect of hospitalization on the sleep pattern and on cortisol secretion of healthy elderly. *Exp Aging Res* 2003; 29: 425-436.
6. Catallani B, Palma BD, Gil FZ, Suchecki D. Brief and long maternal separations decrease corticosterone secretion in a lupus-prone strain: dissociation from disease-related parameters. *Brain Behav Immun* 2008; 22: 367-374.
7. Dametto M, Suchecki D, Bueno OF, Moreira KM, Tufik S, Oliveira MG. Social stress does not interact with paradoxical sleep deprivation-induced memory impairment. *Behav Brain Res* 2002; 129: 171-178.
8. Faturi CB, Tiba PA, Kawakami SE, Catallani B, Kerstens M, Suchecki D. Disruptions of the mother-infant relationship and stress-related behaviours: altered corticosterone secretion does not explain everything. *Neurosci Biobehav Rev* 2010; 34: 821-834.
9. Galvão Mde O, Sinigaglia-Coimbra R, Kawakami SE, Tufik S, Suchecki D. Paradoxical sleep deprivation activates hypothalamic nuclei that regulate food intake and stress response. *Psychoneuroendocrinology* 2009; 34: 1176-1183.
10. Girardi CE, Tiba PA, Llobet GB, Levin R, Abilio VC, Suchecki D. Contextual exploration previous to an aversive event predicts long-term emotional consequences of severe stress. *Front Behav Neurosci* 2013; 7: 134.
11. Guijarro JZ, Tiba PA, Ferreira TL, Kawakami SE, Oliveira MG, Suchecki D. Effects of brief and long maternal separations on the HPA axis activity and the performance of rats on context and tone fear conditioning. *Behav Brain Res* 2007; 184: 101-108.
12. Hamani C, Machado DC, Hipólido DC, Dubiela FP, Suchecki D, Macedo CE, Tescarollo F, Martins U, Covolan L, Nobrega JN. Deep brain stimulation reverses anhedonic-like behavior in a chronic model of depression: role of serotonin and brain derived neurotrophic factor. *Biol Psychiatry* 2012; 71(1):30-35.
13. Hipólido DC, Suchecki D, Pimentel de Carvalho Pinto A, Chiconelli Faria E, Tufik S, Luz J. Paradoxical sleep deprivation and sleep recovery: effects on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity, energy balance and body composition of rats. *J Neuroendocrinol* 2006; 18: 231-238.

14. Kawakami SE, Quadros IM, Machado RB, Suchecki D. Sex-dependent effects of maternal separation on plasma corticosterone and brain monoamines in response to chronic ethanol administration. *Neuroscience* 2013; 253: 55-66.
15. Kawakami SE, Quadros IM, Takahashi S, Suchecki D. Long maternal separation accelerates behavioural sensitization to ethanol in female, but not in male mice. *Behav Brain Res* 2007; 184: 109-116.
16. Machado RB, Tufik S, Suchecki D. Role of corticosterone on sleep homeostasis induced by REM sleep deprivation in rats. *PLoS One* 2013; 8: e63520.
17. Machado RB, Tufik S, Suchecki D. Modulation of Sleep Homeostasis by Corticotropin Releasing Hormone in REM Sleep-Deprived Rats. *Int J Endocrinol* 2010; 2010: 326151.
18. Machado RB, Tufik S, Suchecki D. Chronic stress during paradoxical sleep deprivation increases paradoxical sleep rebound: association with prolactin plasma levels and brain serotonin content. *Psychoneuroendocrinology* 2008; 33: 1211-1224.
19. Machado RB, Suchecki D, Tufik S. Sleep homeostasis in rats assessed by a long-term intermittent paradoxical sleep deprivation protocol. *Behav Brain Res* 2005; 160: 356-364.
20. Palma BD, Suchecki D, Tufik S. Differential effects of acute cold and footshock on the sleep of rats. *Brain Res.* 2000; 861: 97-104.
21. Rosenfeld P, Ekstrand J, Olson E, Suchecki D, Levine S. Maternal regulation of adrenocortical activity in the infant rat: effects of feeding. *Dev Psychobiol* 1993; 26: 261-277.
22. Rosenfeld P, Suchecki D, Levine S. Multifactorial regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during development. *Neurosci Biobehav Rev* 1992; 16: 553-568.
23. Suchecki D, Antunes J, Tufik S. Palatable solutions during paradoxical sleep deprivation: reduction of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and lack of effect on energy imbalance. *J Neuroendocrinol* 2003; 15: 815-21.
24. Suchecki D, Tiba PA, Tufik S. Paradoxical sleep deprivation facilitates subsequent corticosterone response to a mild stressor in rats. *Neurosci Lett* 2002; 320: 45-48.
25. Suchecki D, Tiba PA, Tufik S. Hormonal and behavioural responses of paradoxical sleep-deprived rats to the elevated plus maze. *J Neuroendocrinol* 2002; 14: 549-554.
26. Suchecki D, Duarte Palma B, Tufik S. Sleep rebound in animals deprived of paradoxical sleep by the modified multiple platform method. *Brain Res* 2000; 875: 14-22.
27. Suchecki D, Duarte Palma B, Tufik S. Pituitary-adrenal axis and behavioural responses of maternally deprived juvenile rats to the open field. *Behav Brain Res* 2000; 111: 99-106.
28. Suchecki D, Tufik S. Social stability attenuates the stress in the modified multiple platform method for paradoxical sleep deprivation in the rat. *Physiol Behav* 2000; 68: 309-316.
29. Suchecki D, Lobo LL, Hipólido DC, Tufik S. Increased ACTH and corticosterone secretion induced by different methods of paradoxical sleep deprivation. *J Sleep Res* 1998; 7: 276-281.
30. Suchecki D, Tufik S. Long-term effects of maternal deprivation on the corticosterone response to stress in rats. *Am J Physiol* 1997; 273: R1332-R1328.

31. Suchecki D, Nelson DY, Van Oers H, Levine S. Activation and inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of the neonatal rat: effects of maternal deprivation. *Psychoneuroendocrinology* 1995; 20: 169-182.
32. Suchecki D, Rosenfeld P, Levine S. Maternal regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat: the roles of feeding and stroking. *Brain Res Dev Brain Res* 1993; 75: 185-192.
33. Suchecki D, Mozaffarian D, Gross G, Rosenfeld P, Levine S. Effects of maternal deprivation on the ACTH stress response in the infant rat. *Neuroendocrinology* 1993; 57: 204-212.
34. Suchecki D, Palermo Neto J. Prenatal stress and emotional response of adult offspring. *Physiol Behav.* 1991; 49: 423-426.
35. Tiba PA, Tufik S, Suchecki D. Long lasting alteration in REM sleep of female rats submitted to long maternal separation. *Physiol Behav* 2008; 93: 444-452.
36. Tiba PA, Oliveira MG, Rossi VC, Tufik S, Suchecki D. Glucocorticoids are not responsible for paradoxical sleep deprivation-induced memory impairments. *Sleep* 2008; 31: 505-515.
37. Tiba PA, Tufik S, Suchecki D. Effects of maternal separation on baseline sleep and cold stress-induced sleep rebound in adult Wistar rats. *Sleep* 2004; 27: 1146-1153.

1. Introdução

A adversidade faz parte da vida e os organismos são dotados de mecanismos fisiológicos que lhes permitem enfrenta-las. O acionamento destes mecanismos resulta em alterações metabólicas e comportamentais que garantem a sobrevivência do indivíduo e incluem aumento do aporte de glicose para músculos esqueléticos e encéfalo, aumento da vigília e atenção voltada ao estímulo, inibição da fome, etc. As consequências destas respostas adaptativas envolvem o aprendizado e memorização da situação desencadeante e das respostas bem-sucedidas de modo a permitir que em situações futuras, o organismo lance mão dessas estratégias.

A capacidade individual de responder adequadamente aos eventos estressores depende da interação entre o arcabouço genético e o ambiente (Plotsky et al., 1998), de forma que essa influência atua desde a vida intra-uterina até o envelhecimento. Os efeitos de programação que o estresse pode exercer sobre a trajetória do desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) dependem da idade (janelas de vulnerabilidade) em que o organismo é submetido ao estímulo, sendo que o período neonatal e a adolescência representam fases do desenvolvimento especialmente propícias para alterar a programação da resposta ao estresse, uma vez que o encéfalo encontra-se em transformação, pela grande atividade neuroplástica (Andersen and Teicher, 2008) e do suporte social encontrado nesses momentos (Cohen and Wills, 1985; Kessler et al., 1985).

A ontogênese da resposta neuroendócrina de estresse e a importância da presença materna para garantir o desenvolvimento adequado dessa resposta são de especial interesse, em vista dos numerosos estudos epidemiológicos que sustentam a hipótese de que o estresse neonatal representa um dos mais poderosos fatores de risco para o desencadeamento de doenças psiquiátricas (Agid et al., 1999; Bremne and Vermetten, 2001; Essex et al., 2011; Graham et al., 1999; Hazel et al., 2008; Heim et al., 2008), imunológicas (Pace et al., 2006; Vig et al., 2010) e metabólicas (Alciati et al., 2013; Coplan et al., 2011; Tyrka et al., 2012; Zeugmann et al., 2012) associadas ao estresse na idade adulta. Entretanto, estudos recentes vêm demonstrando que o estresse neonatal pode representar um evento preparatório para o futuro enfrentamento bem-sucedido de situações adversas (Levine and Mody, 2003; Lyons and Parker, 2007; Lyons et al., 2009; Nederhof and Schmidt, 2012).

A partir da análise crítica e contextualizada das publicações da candidata e dos estudos em andamento (cujos resultados serão apresentados em forma de gráficos), esta tese de Livre Docência procurará mostrar que estímulos estressores aplicados ao longo

da vida podem resultar em alterações fisiológicas e comportamentais, que dependerão da história pregressa do organismo, de estilos de enfrentamento de estresse, da natureza do estímulo estressor e de sua cronicidade.

2. Estresse: A incansável busca por uma definição

*In the body, as in a chain, the weakest link breaks down under stress,
although all parts are equally exposed to it¹*

Hans Selye (Selye, 1974)

¹ N.A. No organismo, assim como em uma corrente, o elo mais fraco quebra sob estresse, embora todas as partes sejam igualmente expostas a ele.

O organismo vivo adapta-se constantemente ao meio ambiente, mas o encéfalo é o órgão primário na adaptação a um ambiente em constante mudança. É ele que define o que é relevante ou não para o organismo e, dessa forma, recruta os sistemas endógenos a responder a essas alterações. No entanto, o reconhecimento da capacidade adaptativa e de resiliência do encéfalo, não apenas durante o desenvolvimento, mas também na idade adulta, ocorreu apenas nas últimas décadas (Karatsoreos and McEwen, 2011).

Neste primeiro capítulo, farei uma breve exposição sobre a evolução do conceito de estresse que, como todo conceito, vem sendo moldado desde sua concepção até os dias de hoje para contemplar novos conhecimentos adquiridos. Devemos a introdução do conceito de estresse a Hans Selye, que devotou sua vida ao estudo das reações orgânicas a agentes nocivos. Essas reações serão denominadas, nessa tese, *respostas de estresse* e os agentes nocivos, *estressores*.

2.1. Hans Selye e a Síndrome Geral de Adaptação

Hans Selye nasceu na Hungria em 1907 e faleceu no Canadá, onde lecionou na Universidade de Montreal, em 1982. Em seu artigo de 1965, *Stress and Disease*, Selye descreve sua experiência como estudante de medicina interna na Universidade Carlos, em Praga, quando visitava doentes que se encontravam em diferentes estágios de doenças infecciosas. Ao visitar a enfermaria do hospital da Universidade, Selye percebeu que antes mesmo de se determinar os agentes etiopatogênicos das diversas doenças que acometiam os pacientes, todos eles apresentavam sinais e sintomas idênticos, como perda de peso e de apetite, dores articulares difusas, fadiga e distúrbios intestinais. Selye acreditava que os sinais inespecíficos eram importantes, enquanto seu professor enfatizava a importância dos sintomas específicos. Assim, as perguntas que Selye se fez em relação aos sintomas inespecíficos das doenças, foram os passos iniciais para sua descoberta da **Síndrome de Estresse** ou **Síndrome de Adaptação Geral** (Selye, 1965).

Em 1936, Selye e seu grupo procuravam encontrar um novo hormônio em extratos de ovários em bovinos e todos eles, independente de seu preparo, produziam a mesma síndrome quando injetados em outros animais: hipertrofia do córtex das glândulas adrenais, atrofia do timo e dos nódulos linfáticos e úlceras gástricas. Após inúmeras tentativas frustradas de purificar o hormônio contido nesses extratos, ocorreu a Selye que essa síndrome seria, na realidade, uma resposta generalizada do organismo a agentes nocivos. Assim, testando inúmeros estímulos, Selye percebeu que agentes tão variados

como extratos de órgãos, raios-X, temperaturas extremas e infecções produziam a mesma resposta estereotipada. Segundo Selye, esses parâmetros replicáveis formaram a base do desenvolvimento do conceito de estresse. Dessa forma, ficou evidente para Selye, que *“qualquer agente que demanda um aumento vital de atividade, automaticamente elicia um mecanismo inespecífico de defesa, que aumenta a resistência a agentes estressores”* (Selye, 1936; Selye, 1950).

A Síndrome de Estresse ou Síndrome de Adaptação Geral evolui em três fases distintas (Figura 2.1): 1. Reação de Alarme, durante a qual, os mecanismos de defesa são mobilizados; 2. Resistência, que reflete a adaptação completa ao estressor; 3. Exaustão, que resulta da exposição prolongada e intensa ao estressor, produzindo o que Selye denominou de “Doenças de Adaptação” (Selye, 1936; Selye, 1955; Selye, 1965; Szabó et al., 2012).

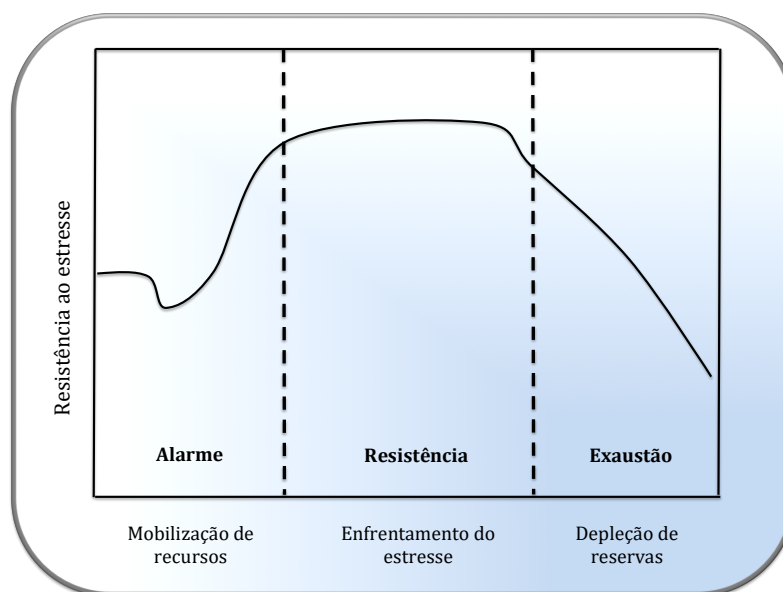


Figura 2.1 – As três fases da Síndrome de Adaptação Geral, proposta por Hans Selye em 1950 (Adaptado de <http://www.stress-management-for-peak-performance.com/general-adaptation-syndrome.html>)

Desde o início de seus estudos, Selye reconhecia a importância dos glicocorticoides (GCs – cortisol em seres humanos ou corticosterona em ratos e camundongos, que serão denominados CORT nesta tese) como agentes protetores da síndrome de estresse. Os GCs são hormônios esteroides liberados pelas glândulas adrenais em resposta a agentes estressores e sua ausência, que pode ser produzida pela adrenalectomia (ADX, ou seja, retirada das glândulas adrenais), acarreta danos profundos para a saúde, o que levou Selye a concluir que a função das adrenais é aumentar a resistência do organismo aos estressores (Selye, 1937). Essa hipótese é também compartilhada por outros especialistas

em glândulas adrenais e GCs, uma vez que esses hormônios, por meio de suas ações permissivas e estimuladoras, auxiliam o funcionamento adequado de diversos sistemas fisiológicos (Munck et al., 1984; Sapolsky et al., 2000). Além disso, Selye também acreditava que o estresse é uma necessidade da vida e que não deve e não pode ser evitado, pois a resposta adequada de estresse pode, na verdade, ser uma proteção contra certas doenças. Conduzindo experimentos pré-clínicos, Selye demonstrou que a exposição prévia de animais a estressores prevenia o desenvolvimento de inflamações e alergias, assim como impedia infartos cardíacos fatais provocados pela administração de corticóides + sódio. Assim, surgiram os conceitos de distresse, que se refere ao aspecto negativo, e eustresse, que se refere ao aspecto positivo do estresse (Selye, 1974; Selye et al., 1974).

Os efeitos protetores e permissivos dos GCs são especialmente evidentes em indivíduos que apresentam hipoatividade (baixas concentrações basais desses hormônios) e hiporreatividade ao estresse (liberação insuficiente de GCs em resposta ao estressor). Embora exista um consenso de que a secreção excessiva ou prolongada de GCs seja prejudicial à saúde, tem se demonstrado que sua liberação insuficiente em resposta ao estresse também pode ter consequências desastrosas para a saúde (Figura 2.2).

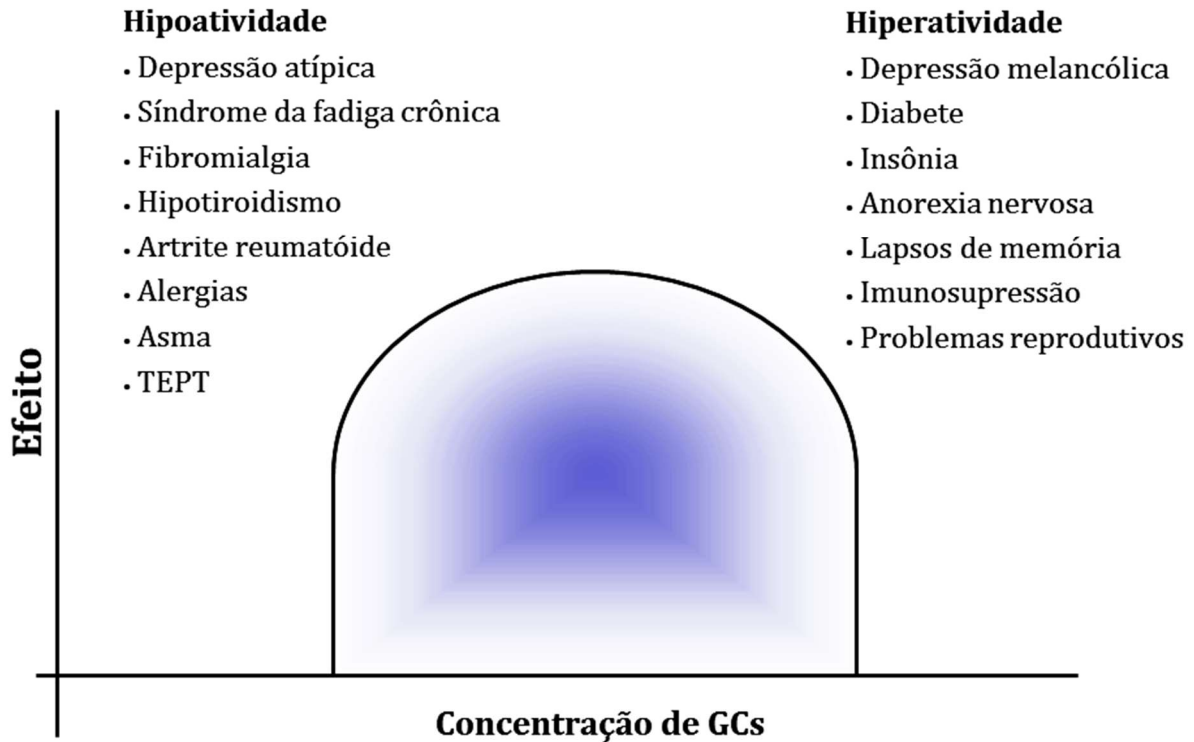


Figura 2.2 – Ilustração hipotética das consequências da inadequação da resposta de estresse. Se, por um lado, a secreção excessiva ou prolongada de GCs produz doenças classicamente relacionadas ao estresse, por outro lado, baixa secreção também tem consequências prejudiciais à saúde. TEPT: transtorno de estresse pós-traumático. (Adaptado de (McEwen and Lasley, 2002)).

2.2. A Psicologia dá sua contribuição para o conceito de estresse

Em seus experimentos pré-clínicos, Selye sempre empregava estressores físicos: mergulhos em água fria, exposição ao frio ou ao calor e exercício físico intenso, obtendo sempre os mesmos resultados (Selye, 1955; Selye, 1965), como já foi exposto anteriormente. Embora os conceitos elaborados por Selye tenham sido a base para uma nova área de estudos, estes mostraram-se insuficientes para explicar todas as implicações psicogênicas decorrentes do estresse e, em 1968, John Mason publicou uma revisão em que ficou claro que os estressores psicológicos são potentes ativadores da medula (Mason, 1968b) e do córtex (Mason, 1968a) das glândulas adrenais, resultando em liberação de noradrenalina/adrenalina e de GCs, respectivamente. A partir desse momento, os fatores psicológicos foram incorporados à definição de estresse. Para a nossa espécie, os estressores mais relevantes são os psicológicos, aqueles que envolvem situações emocionais, como por exemplo, a perda ou a doença de entes queridos, pressões do trabalho, pressões sociais, separações, problemas com filhos, etc. Apesar de reconhecermos que essas situações produzem uma enorme pressão, o que para uns é considerado negativo, para outros pode ser positivo. Portanto, no conceito mais atual de

estresse, existe um fator de extrema importância: a cognição. Nesse conceito, o encéfalo funciona como um filtro que avalia quais estímulos são ou não ameaçadores e gerenciáveis, sendo que a resposta de estresse será desencadeada de acordo com a percepção individual do evento.

De acordo com Seymour Levine e Holger Ursin (1991), a definição de estresse incorpora quatro elementos fundamentais: 1) Estímulo, 2) Sistema de processamento (sistema nervoso central – SNC), 3) Resposta, 4) Consequências. O estímulo é o próprio estressor, que pode ser fisiológico (cirurgia, hipoglicemia, hipovolemia, lesões, infecções) ou psicológico (perda de entes queridos, separações, ambiente/condições de trabalho, conflitos familiares ou sociais, situações traumáticas inescapáveis). Como salientado anteriormente, os estímulos fisiológicos, invariavelmente, resultarão em uma resposta de estresse, pois todos os sistemas deverão ser mobilizados para restaurar a homeostasia. No caso dos estímulos psicogênicos, existem fatores psicológicos e cognitivos que influenciam a percepção do estímulo pelo indivíduo, embora não se possa excluir esses fatores de alguns estressores físicos como dor crônica. Assim, podemos considerar que o SNC atua como um “filtro” que avalia o estímulo, antes que este ganhe acesso a qualquer sistema de resposta. O princípio básico de avaliação do estímulo é realizado por meio de comparações. Por exemplo, situações de novidade, incerteza, ambiguidade ou ameaçadoras, são comparadas com situações prévias que ficam armazenadas no SNC (daí a importância da ativação dos sistemas de resposta ao estresse para a memória). Ainda, segundo esses autores, essas comparações podem ser consideradas como expectativas, de modo que eventos psicológicos, tais como a incapacidade de alcançar as expectativas ou a ausência de expectativa de reforço positivo, podem gerar resposta de estresse (Levine e Ursin, 1991).

O SNC é passível de modificações que podem torná-lo mais ou menos sensível ao impacto de eventos estressores. Por exemplo, as respostas de estresse são influenciadas pela natureza do estressor, tipo de personalidade, apoio social, hierarquia social (para revisão, ver (Chida and Hamer, 2008; Flinn and England, 1997; Kudielka et al., 2009), *status* sócio-econômico (Lupien et al., 2000; McEwen and Gianaros, 2010), controle da situação (Levine and Ursin, 1991) e co-morbididades, como depressão (Diener et al., 2009) e ansiedade (Rosnick et al., 2013). Um aspecto importante para moldar o filtro, diz respeito às consequências que advêm dos comportamentos e atitudes diante do estressor. A Teoria Cognitiva Ativadora do Estresse incorpora quatro conceitos fundamentais, três

dos quais já foram citados - o estímulo ou estressor, o processador de informações ou o cérebro e a resposta de estresse – e acrescenta o conceito de retroalimentação, em que as consequências da resposta de estresse, seja ela comportamental ou fisiológica, serão armazenadas na memória e resgatadas quando necessário (Ursin and Eriksen, 2004).

Basicamente, existem três consequências que determinarão como serão as respostas de estresse subsequentes:

- 1) *Coping* ou enfrentamento: refere-se à maneira como o indivíduo enfrenta situações de estresse. O *coping* é um processo de interação do indivíduo com seu ambiente, cuja função é de administrar a situação estressora de modo a reduzi-la, minimizá-la ou tolerá-la (Antoniazzi et al., 1998; Folkman et al., 1986a). As estratégias de enfrentamento são classificadas em oito domínios: Confronto (enfrentamento sem flexibilidade ou concessões); Afastamento (distanciamento ou negação para evitar contato com a situação); Autocontrole (esforços para controlar os sentimentos); Suporte social (busca de informações e ajuda de terceiros); Aceitação de responsabilidade (reconhecimento da participação no problema e motivação para solucioná-lo); Fuga e esquiva (comportamento direcionado para escapar ou evitar a situação); Resolução de problemas (enfoque no problema para alterar a situação e solucioná-lo); Reavaliação positiva (reinterpretação favorável das situações adversas). A escolha da estratégia de enfrentamento depende de experiências prévias, do estímulo estressor e contexto (situações controláveis geram estratégias ativas, enquanto que as incontroláveis, passivas), de crenças, das condições de saúde do indivíduo, sexo, suporte social (Antoniazzi et al., 1998). As estratégias adaptativas reduzem o estresse e promovem saúde, enquanto que as mal-adaptativas, como uso exagerado de drogas ou medicamentos, não modificam a situação e causam danos à saúde (Folkman et al., 1986b).
- 2) *Helplessness* ou desamparo: refere-se a situações em que o indivíduo não consegue estabelecer qualquer relação entre suas atitudes e as prováveis consequências. O desamparo ocorre quando o indivíduo aprende que existe uma probabilidade muito remota de que qualquer resposta comportamental resultará em alguma consequência.
- 3) *Hopelessness* ou desespero: refere-se ao aprendizado de que qualquer que seja a resposta comportamental, a consequência será negativa, ou resultará em punição.

É importante salientar que os três conceitos expostos acima são extensivamente utilizados nos estudos sobre estresse. As estratégias de *coping* podem ser empregadas para discriminar indivíduos vulneráveis ou resilientes às doenças desencadeadas pelo estresse (Cabib et al., 2012; Hawley et al., 2010) e o desamparo aprendido vale-se do conhecimento da falta de controle sobre a situação (Seligman, 1972; Wagner et al., 1977).

3. Conceitos atuais de estresse

A definição de estresse como uma “ameaça à homeostasia” pode parecer sem sentido, uma vez que virtualmente todas as atividades de um organismo, direta ou indiretamente, estão relacionadas à ameaça e restauração da homeostasia (Koolhaas et al., 2011). Além disso, tal definição é ampla demais para contemplar as sutilezas decorrentes da influência genética e ambiental que, em última instância, determinam a percepção individual de um evento como sendo ou não estressor. Na tentativa de sanar essa “deficiência” conceitual, duas novas abordagens foram propostas recentemente e serão apresentadas a seguir:

3.1.1. Alostasia e Carga alostática

O conceito de alostasia surgiu como uma contraposição ao conceito de homeostasia. Alostasia significa, literalmente, “estabilidade através de mudanças” (McEwen, 1998) e o conceito foi elaborado a partir do pressuposto de que a constância do meio interno – homeostasia – não é compatível com as demandas fisiológicas que flutuam constantemente e necessitam de mudanças correspondentes na magnitude das respostas. Sendo assim, correções por *feedback* negativo (fundamento da homeostasia) para manter a constância dificultam as respostas adequadas às mudanças de demanda (Sterling, 2012). Para Sterling, a alostasia permite que o cérebro preveja as necessidades, eliciando reações fisiológicas adequadas e integradas, a fim de restaurar a “flexibilidade da capacidade de resposta para mudar de acordo com as demandas previstas e preservar o alcance da responsividade” (Sterling, 2012).

De acordo com revisões mais recentes de Bruce McEwen (este autor escreveu o número absurdo de 31 **revisões** sobre alostasia e carga alostática em 20 anos!) as respostas alostáticas compreendem alterações fisiológicas que ocorrem em função de perturbações no meio-ambiente. Essas alterações não são consideradas prejudiciais por si sós; pelo contrário, considera-se que tenham uma função primordial na adaptação do

organismo ao seu meio-ambiente (Karatsoreos and McEwen, 2011). Portanto, alostasia não deve ser uma substituição para o termo estresse, mas sim, um termo que reflete a importância da resposta de estresse para a sobrevivência. O conceito de alostasia enfoca os mediadores da resposta de estresse, i.e., o sistema nervoso autonômico, glicocorticoides, hormônios metabólicos e o sistema imunológico. Portanto, é essencial que ocorra equilíbrio entre esses mediadores, uma vez que o excesso, ou inadequação da resposta de um deles, pode gerar desequilíbrios na atividade dos outros (Figura 2.3).

A alostasia ou carga alostática não se aplicam apenas ao corpo, mas também ao cérebro, uma vez que a atividade neuronal em resposta a novas experiências estimula a plasticidade adaptativa, mediada, em parte, por hormônios, neurotransmissores, aminoácidos excitatórios, fatores neurotróficos, etc. A forma como esses mediadores são recrutados e regulados em momentos de estresse parece determinar a vulnerabilidade e resiliência a esses eventos e falhas nessa regulação podem resultar em carga alostática (Karatsoreos e McEwen, 2011).

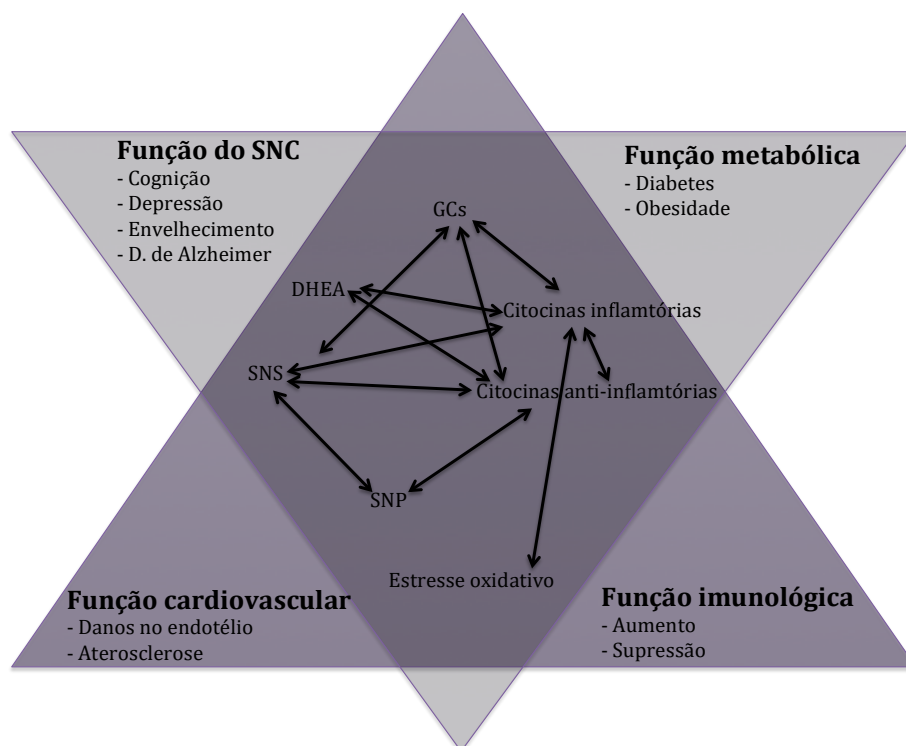


Figura 2.3 – Rede não-linear de mediadores da alostasia envolvidos na resposta de estresse. As setas indicam as mútuas regulações entre sistemas, frequentemente, de forma recíproca, e às vezes, indireta. Ademais, existem múltiplas vias reguladoras, como, por exemplo, no caso da produção de citocinas inflamatórias que é regulada negativamente pelas citocinas anti-inflamatórias e pelo sistema parassimpático e GCs, enquanto que o sistema simpático estimula a produção dessas citocinas (Adaptado de (Karatsoreos and McEwen, 2011)). DHEA: Dehidroepiandrosterona; SNP: Sistema nervoso parassimpático; SNS: Sistema nervoso simpático.

Ao compararmos a definição de alostasia elaborada por Sterling com a que é correntemente utilizada por Bruce McEwen, que a alterou para adequá-la às situações de estresse, é possível observar que a mesma não difere do que é conhecido como homeostasia. Assim, os pouquíssimos artigos que se opõem ao uso de uma nova nomenclatura para se referir a um conceito clássico procuram chamar a atenção da comunidade científica para a desnecessária introdução de uma nova “pseudo-definição” (Dallman, 2003; Day, 2005). Trevor Day (Day, 2005) propõe que a definição de Selye para estresse “*resposta não específica do organismo a qualquer demanda*” (Selye, 1936) seja refreada para “*Estresse é a resposta multi-sistêmica do organismo aos desafios que suplantam, ou são percebidos como tal, os mecanismos seletivos de resposta homeostática*”. Esta definição não estabelece quais estímulos podem ser considerados estressores, porém, alguns estudos que mapeiam a atividade cerebral em decorrência de estímulos físicos ou de estímulos psicológicos sugerem a existência de diferentes neurocircuitos, que lançam projeções para o núcleo paraventricular do hipotálamo (NPV), a fim de desencadear a resposta neuroendócrina de estresse (Dayas et al., 2001; Herman et al., 2003; Pacák and Palkovits, 2001; Sawchenko et al., 2000).

3.1.2. Falta de controle, imprevisibilidade e capacidade adaptativa

Em 2009, um grupo de estudiosos do estresse, se reuniu para redefinir aspectos conceituais, de importância essencial para a pesquisa nesse campo do conhecimento (Koolhaas et al., 2011). A leitura da revisão que resultou desse encontro é obrigatória para os interessados em estudar estresse e apresenta evidências experimentais que fundamentam a conclusão de que estressores são situações imprevisíveis, em que há falta de controle e que estão além da capacidade adaptativa e regulatória do indivíduo. Assim posta, essa conceituação não somente descarta inúmeros estímulos (que inicialmente podem até ser considerados estressores, mas que cronicamente perdem esse caráter), como leva em consideração o fundamental e indispensável reconhecimento da importância da variabilidade individual para a resposta de estresse.

No início dos anos 1970, Weiss publicou uma série de estudos sobre a importância do controle e da previsibilidade do estressor para a indução de estados patológicos. Em um desses estudos, grupos de ratos receberam choques de forma previsível (tons ou sinais luminosos emitidos 10 s antes do choque – 3,5 mA, 2 s de duração) ou imprevisível

(sinais sem contingência temporal com o choque), em intervalos variáveis, em média, de 60 s. Esses grupos foram comparados a um grupo controle, que não recebeu nenhum choque e os parâmetros analisados foram a formação de úlceras gástricas, temperatura corporal, secreção de CORT, ganho de peso corporal e ingestão de água e alimento. Para todos estes parâmetros, ficou evidente que o choque imprevisível produziu as alterações mais intensas, enquanto que o choque previsível resultou em mudanças intermediárias entre os grupos choque imprevisível e controle (Weiss, 1970). Mais recentemente, demonstrou-se que o choque nas patas não escapável (que representa a falta de controle da situação) ativa regiões cerebrais envolvidas com a resposta de estresse (Liu et al., 2009), enquanto que o mesmo não é visto em paradigma de choque escapável (no qual o animal recebe a mesma quantidade de choques, porém tem controle sobre a situação), indicando que não é o estímulo *per se* que desencadeia as respostas comportamentais e fisiológicas de estresse, mas sim, os fatores psicológicos associados à situação. Além da importância da imprevisibilidade, o conhecimento de que não é possível escapar de uma situação traumática (choque nas patas, 2 mA, 1 s de duração) pode gerar alterações emocionais duradouras. Neste estudo avaliamos as respostas de ansiedade, generalização do medo e de sobressalto em três grupos de animais. O primeiro deles foi alojado por 2 min em uma caixa com grades eletrificadas, mas não recebeu choque (grupo controle – CTL); o segundo grupo foi alojado na mesma caixa e recebeu o choque com as características descritas acima e imediatamente retirado da caixa (choque imediato) e o terceiro grupo permaneceu por 2 min na caixa, quando então recebeu o choque nas patas (choque contexto). Esse tempo foi importante para que o animal associasse o ambiente ao evento aversivo. Quando foram reexpostos ao mesmo ambiente do choque, duas semanas depois, o grupo choque contexto exibiu maior expressão de comportamento de medo, no qual o animal cessa todos os movimentos corpóreos, mantendo apenas os respiratórios (comportamento de *freezing* ou congelamento). Nos testes subsequentes de avaliação do medo, os animais do grupo choque contexto apresentaram as reações mais intensas, enquanto que o grupo choque imediato foi semelhante ao grupo CTL (Girardi et al., 2013).

A falta de controle como estímulo estressor também pode ser exemplificada quando um macho dominante em uma configuração social estável perde o controle ou até pode ser ameaçado em uma situação instável (Sapolsky, 1995). De fato, em um estudo sobre privação de sono REM (do acrônimo para *Rapid eye movements*; SREM) em grupos socialmente estáveis ou instáveis, observamos que animais do grupo controle que

permaneceram com co-habitantes desconhecidos por quatro dias (a mesma duração da privação de sono) apresentaram aumento dos índices clássicos de resposta de estresse (Suchecki and Tufik, 2000).

A capacidade adaptativa inclui respostas comportamentais (em situações naturais podemos citar as migrações sazonais, aumento de ingestão calórica e construção de ninhos para proteção contra o inverno) e fisiológicas (mudanças do ajuste de temperatura corporal, da fisiologia cardiovascular e do metabolismo para iniciar o estado de hibernação), de forma que a capacidade adaptativa plena recruta o SNC, aspectos fisiológicos periféricos e o comportamento. Entretanto, várias situações podem dificultar ou reduzir a capacidade adaptativa, como, por exemplo, quando ocorre um incêndio florestal que compromete o suprimento de alimentos, prejudicando a ingestão calórica para o acúmulo de gordura corporal, prejudicando a capacidade do indivíduo em enfrentar temperaturas congelantes. Essa situação imprevisível e incontrolável será percebida como um estressor, desencadeando, assim a resposta de estresse. Agregando esses aspectos, o grupo de estudiosos definiu estresse como um estímulo ou condição ambiental na qual as demandas excedem a capacidade adaptativa do organismo. Demandas que se encontram na faixa da capacidade adaptativa pertencem ao domínio da fisiologia e comportamentos normais e, portanto, não devem ser classificados como estressores (Koolhaas et al., 2011).

3. Os Sistemas de Resposta ao Estresse

Ontogênese e Diferenças sexuais

A resposta de estresse em mamíferos é efetuada por dois sistemas independentes, cujas ações são inter-relacionadas: o sistema nervoso autonômico simpático (SNS), representado pelo *locus coeruleus* (LC)/medula adrenal – cujo produto periférico final é a adrenalina – e o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA, acrônimo de *hypothalamic-pituitary-adrenal*) – cujo produto periférico final é CORT.

A exposição de organismos a eventos estressores, sejam estes de natureza física ou psicológica, resulta na ativação de neurônios pré-ganglionares do SNS na coluna intermédia-lateral da medula tóraco-lombar. Estes neurônios enviam projeções para os gânglios pré- ou para-vertebrais, que por sua vez, enviam projeções para os órgãos periféricos efetores, incluindo a medula das glândulas adrenais. Essa ativação simpática representa a resposta clássica de “luta-ou-fuga” descrita por Walter Cannon e colaboradores no início do século XX (citado em (Ulrich-Lai and Herman, 2009)) e resulta em aumento das concentrações sanguíneas de adrenalina, secretada pela medula adrenal, e de noradrenalina (NA), liberada pelos nervos simpáticos. Ao atuar nos órgãos-alvo, essas catecolaminas produzem aumento da frequência e da força de contração cardíacas, vasoconstrição periférica e mobilização de fontes de energia, pela ação da adrenalina no fígado, que estimula a glicogenólise e, conseqüentemente, aumento da glicemia. As respostas autonômicas periféricas são rapidamente controladas pelo SNP, que se origina nos núcleos pré-ganglionares crânio-sacrais e cuja ação é, geralmente, oposta à do SNS (Ulrich-Lai and Herman, 2009). Embora a adrenalina e NA secretadas perifericamente não atravessem a barreira hemato-encefálica, suas ações têm paralelo àquelas da NA secretada centralmente pelo LC (Svensson, 1987). Neste caso, a função da NA em situações de estresse, é de aumentar a vigília e a atenção voltada para o estímulo estressor, além de estimular a atividade do eixo HPA (Gunnar and Quevedo, 2007; Morilak et al., 2005).

A ativação do eixo HPA (Figura 3.1) inicia-se nos neurônios parvocelulares e magnocelulares do NPV onde são sintetizados e de onde são secretados, respectivamente, o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e a arginina vasopressina (AVP). Os neurônios do NPV projetam-se para a eminência mediana do pedúnculo hipofisário (de onde são liberados os neuropeptídeos, no sistema vascular porta-hipofisário), para medula espinhal e para o tronco cerebral, coordenando a resposta autonômica, fisiológica e neuroendócrina aos estímulos estressores (Swanson and Sawchenko, 1980). O NPV é um importante relê que recebe informações de estruturas límbicas que detectam

estressores emocionais ou cognitivos e também de estruturas do tronco cerebral que detectam estímulos físicos, tais como inflamações ou hipotensão (Pacák and Palkovits, 2001). Ao serem liberados, CRH e AVP atuam em conjunto em células especializadas da adeno-hipófise, para induzir a quebra da pró-ópio-melanocortina (POMC), cujos produtos são, entre outros, o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), a β -endorfina e o hormônio estimulador de melanócitos (Figura 4.2). O ACTH, por sua vez, é liberado na corrente sanguínea e ao se ligar aos seus receptores metabotrópicos localizados na membrana das células da zona fasciculada do córtex das glândulas adrenais, estimula a síntese e liberação os GCs (Buckley and Ramachandran, 1981). Os GCs são sintetizados a partir do colesterol em uma sequência enzimática, até a formação de cortisol e/ou corticosterona (Figura 4.3). Uma vez na corrente sanguínea geral, os GCs mobilizam estoques energéticos e potencializam diversos efeitos mediados pelo SNS, como, por exemplo, a vasoconstrição periférica, aumento de glicemia e de oxigenação para os músculos esqueléticos. Sendo assim, o eixo HPA e o SNS atuam de forma complementar em situações de estresse (Ulrich-Lai and Herman, 2009).

As porções centrais desses sistemas também são “parceiras” na resposta de estresse, devido à existência de projeções recíprocas entre o NPV e o LC. Entretanto, o fato de que muitos dos estressores que estimulam o eixo HPA também ativam o LC, poderia sugerir que os estímulos recrutam esses sistemas em paralelo ou que a ativação de um sistema ativa o outro. Evidências anatômicas fornecem a confirmação de que o NPV inerva diretamente o LC, por estudos que utilizam aplicação iontoforética de traçador retrógrado no LC (Aston-Jones et al., 1986; Luppi et al., 1995), bem como por estudos que utilizam marcadores anterógrados infundidos no NPV (Reyes et al., 2005). Comprovação funcional dessa regulação recíproca foi fornecida pela demonstração de que lesão do LC resulta em redução da resposta de ACTH e CORT, somente a uma, mas não a múltiplas sessões, de estresse de restrição (REST) por 30 min (Ziegler et al., 1999). Além disso, a capacidade do álcool em induzir ativação do eixo HPA também é abolida pela lesão eletrolítica do LC e pela administração endovenosa de antagonistas de receptores α e β -adrenérgicos (Selvage, 2012). Finalmente, em um estudo elegante, Radley e colaboradores demonstraram a existência de uma via indireta do LC ao NPV, que passa pelo córtex pré-frontal (CPF) medial. Neste estudo, realizou-se desnervação da projeção noradrenérgica do LC para o CPF medial, cuja resultante foi redução da ativação neuronal no NPV, no ácido

ribonucleico (RNA) mensageiro (RNAm) para CRH e na secreção de ACTH e CORT induzidos por 30 min de REST (Radley et al., 2008).

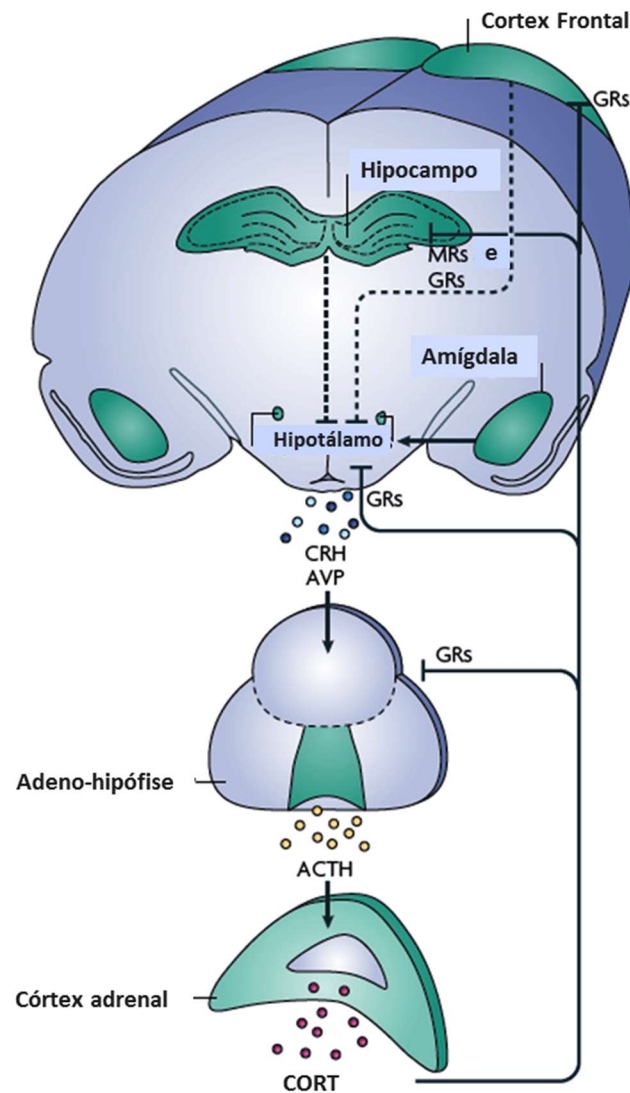


Figura 3.1 - Representação da regulação positiva (estimulação) e negativa (inibição) da atividade do eixo HPA (modificado de (Lupien et al., 2009). Em resposta aos estressores fisiológicos (hipovolemia, frio, hipoglicemia, etc.) ou psicológicos (compromissos, perda de entes queridos, rompimentos afetivos, avaliações de desempenho, etc.), o CRH e a AVP são liberados do NPV do hipotálamo, que estimula a síntese e secreção de ACTH da adeno-hipófise, que, por sua vez, estimula a síntese e secreção de GCs (cortisol em seres humanos e primatas ou corticosterona em roedores). Os GCs atuam nos receptores mineralocorticóides (MR) e glicocorticóides (GR) para regular inibitoriamente a atividade do eixo HPA, prevenindo sua hiperatividade.

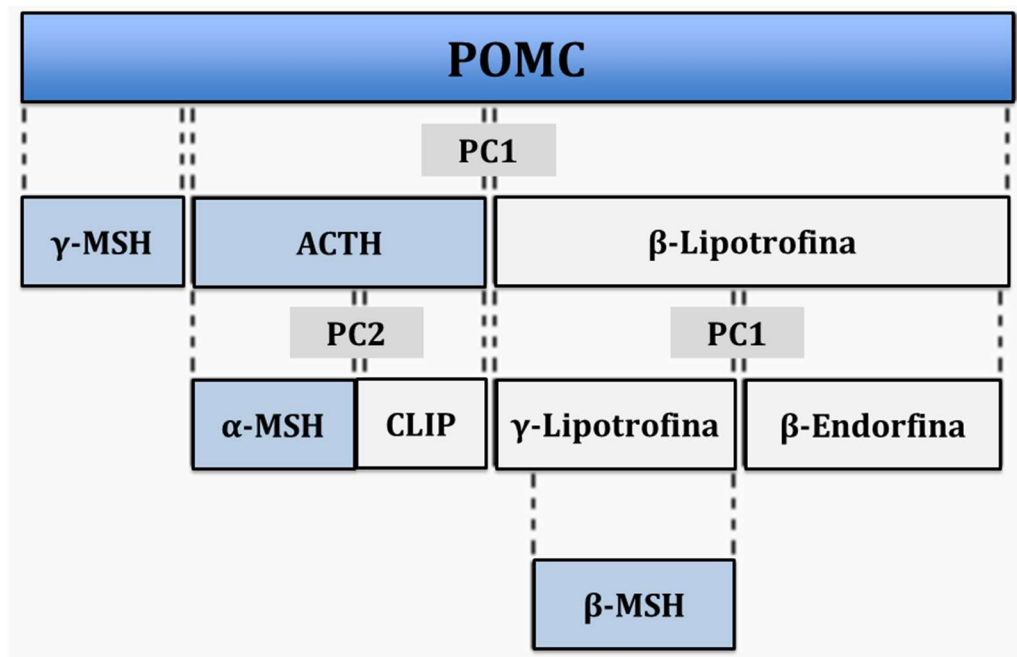


Figura 3.2 – Quebra da POMC na adeno-hipófise resulta em produção de diversos peptídeos (Modificado de (Pritchard et al., 2002)). CLIP: Peptídeo tipo corticotrofina do lobo intermediário da hipófise; MSH: Hormônio estimulante de melanócitos; PC: Pró-convertase.

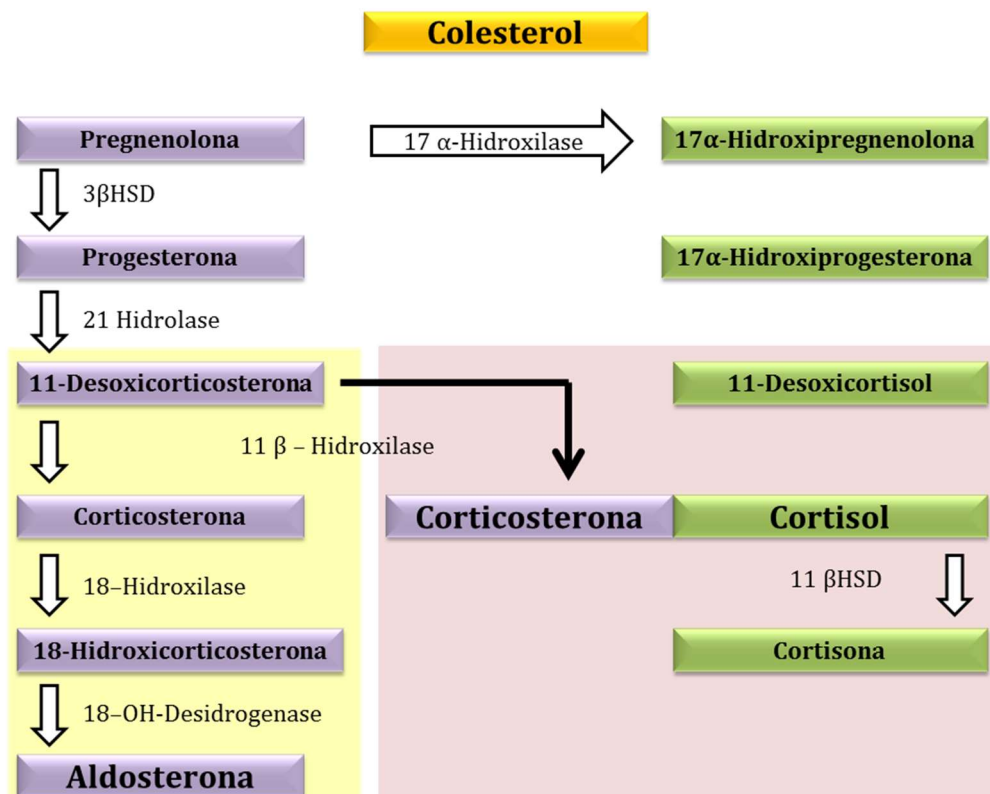


Figura 3.3 – Via de biosíntese dos GCs a partir do colesterol. A porção amarela corresponde à zona glomerulosa, enquanto que a parte rosada corresponde à zona fasciculada das glândulas adrenais. 3βHSD: 3β-Hidroxisteroide desidrogenase; 11βHSD: 11β-Hidroxisteroide desidrogenase (Modificado de www.trinity.edu).

A resposta de estresse obedece a uma sequência temporal bem definida em que a “primeira onda” de resposta a um estímulo é constituída pelas catecolaminas, dopamina (DA) e NA e pelos fatores hipotalâmicos, CRH e AVP. Em seguida os peptídeos hipofisários, ACTH e prolactina (PRL) e a adrenalina são liberados na “segunda onda” de resposta, seguida, finalmente pelo aumento de CORT e redução das concentrações de esteróides sexuais, constituindo, assim a “terceira onda” de resposta de estresse (Sapolsky et al., 2000). Tanto em seres humanos como em roedores, o pico de detecção plasmática de CORT após diferentes estressores ocorre em torno de 20 a 30 min e o retorno às concentrações basais, em torno de 60 a 75 min após o término do estressor (Barbosa Neto et al., 2012; Faturi et al., 2010; Suchecki et al., 2002a; Windle et al., 1998; Young et al., 2004).

A secreção dos hormônios do eixo obedece a um ritmo circadiano bem definido e está sincronizada ao ritmo de atividade, sendo que as concentrações plasmáticas de ACTH e GCs estão aumentadas nos momentos que precedem o período de atividade (pela manhã em seres humanos e à noite em roedores) e reduzidas algumas horas antes do período de repouso (Dallman et al., 1978; Kalsbeek et al., 2012; Weitzman et al., 1971). Os GCs são liberados de forma pulsátil e o ritmo circadiano resulta mais das alterações de amplitude do que de frequência dos pulsos. A regulação do ritmo circadiano é realizada pelo núcleo supraquiasmático no hipotálamo, mas a regulação do ritmo ultradiano é desconhecida (Walker et al., 2010). Além disso, o componente central do eixo também apresenta variação diurna de atividade, dado que o RNAm para a proteína *Fos* no NPV de ratos está aumentado à noite em relação à medida diurna (Girotti et al., 2007).

O conhecimento do padrão circadiano de secreção dos GCs é essencial para a elaboração de protocolos experimentais, visto que a sensibilidade das glândulas adrenais de ratos a estressores é maior pela manhã (Yasuda et al., 1976), embora a sensibilidade ao ACTH seja maior no período noturno (Dallman et al., 1978), a despeito das concentrações basais de CORT serem menores nesse período (Touma et al., 2009; Verma et al., 2010). Em seres humanos, a variação circadiana de secreção de CORT apresenta um padrão oposto àquele descrito para roedores, em que o vale do ritmo ocorre por volta da meia-noite e o pico, aproximadamente 30 min após o despertar (Buckley and Schatzberg, 2005; Young et al., 2004). O aumento da secreção de GCs tem por função preparar o organismo para enfrentar as demandas metabólicas impostas pelo estado ativo do organismo (Born et al., 1999; Dallman et al., 2000) e parece ser consequência da redução

de glicose cerebral que ocorre durante o período de sono, uma vez que, em seres humanos, a reposição de glicose durante a noite reduz o pico de secreção de ACTH e de CORT pela manhã (Benedict et al., 2009).

3.1. Ações do CRH e seus receptores

O CRH é um neuropeptídeo composto por 41 aminoácidos, cuja estrutura foi desvendada em 1981 por Willie Vale e colaboradores. Após a determinação da sequência de aminoácidos (H-Ser-Gln-Glu-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Met-Thr-Lys-Ala-Asp-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Ala-His-Ser-Asn-Arg-Lys-Leu-Leu-Asp-Ile-Ala-NH₂), ensaios de biotividade foram realizados, nos quais se confirmou a potente capacidade do composto em estimular a secreção de ACTH e β -endorfina (Spiess et al., 1981; Vale et al., 1981).

Embora a maior concentração de neurônios produtores de CRH tenha sido inicialmente detectada na porção parvocelular do NPV, ficou claro que estruturas extra-hipotalâmicas também continham esses neurônios e que a ação deste neuropeptídeo não estava restrita apenas ao eixo HPA. Assim, imunorreatividade para CRH é encontrada na área hipotalâmica lateral (AHL), núcleo central da amígdala (CeA), núcleo da *stria terminalis* (BNST), hipocampo (HPC), núcleo *accumbens* (NAcc), LC, núcleos dorsal e medial da Rafe (NDR e NMR) e substância cinzenta periaquedutal (SCP), CPF e córtex cingulado (Merchenthaler, 1984; Potter et al., 1994; Sawchenko et al., 2000; Swanson et al., 1983); essa distribuição no SNC indica que, além de sua função neuroendócrina, o CRH apresenta ações neuromoduladoras importantes para a orquestração da resposta comportamental a estímulos estressores.

Foram identificados dois receptores metabotrópicos, acoplados à proteína G, aos quais o CRH se liga, o receptor 1 (CRHR1) e o receptor 2 (CRHR2), que apresentam afinidades muito distintas por este ligante, além de diferenças de distribuição no SNC. O CRHR2 apresenta duas variantes: CRHR2 α , localizado no SNC (por ser o receptor de maior interesse, será denominado, simplesmente, CRHR2 nesta tese) e CRHR2 β , localizado em tecidos não-neurônais, como plexo coróide, arteríolas, coração e músculos esqueléticos. O CRHR1 apresenta alta afinidade pelo CRH e urocortina, um neuropeptídeo que possui 45% de homologia com o CRH, enquanto que o CRHR2 apresenta alta afinidade por urocortina (Steckler and Holsboer, 1999). O CRHR1 está exclusivamente envolvido com a ativação do eixo HPA, uma vez que a adeno-hipófise apresenta apenas essa classe de

receptores (Steckler e Holsboer, 1999); além disso, antalarmina, um antagonista específico deste receptor suprime a secreção de ACTH e CORT, causa atrofia do córtex da adrenal e aumenta a apoptose da zona fasciculada da adrenal (Bornstein et al., 1998).

Tanto as estruturas que contém neurônios produtores de CRH quanto a distribuição de seus receptores (Figura 3.4) fornecem indícios de suas ações no SNC. Além disso, o impacto da desregulação do sistema do CRH em patologias psiquiátricas, incluindo depressão, ansiedade e TEPT, é evidenciado em inúmeros estudos clínicos e pré-clínicos. Excelentes revisões já foram escritas e podem servir de referência para o conhecimento mais abrangente sobre o tema (Holsboer, 1999; Kasckow et al., 2001; Risbrough and Stein, 2006; Steckler and Holsboer, 1999). Entre os estudos clínicos, os primeiros mostram que pacientes deprimidos apresentam maiores concentrações de CRH no líquido céfalo-raquidiano (Nemeroff et al., 1984), maior imunorreatividade para CRH e AVP no hipotálamo (Raadsheer et al., 1994) e redução da densidade de receptores para CRH no córtex (Nemeroff et al., 1988) em ensaios *post-mortem*. Entretanto, devido às inúmeras diferenças metodológicas e em características das amostras de pacientes, algumas controvérsias emergem na literatura (Holsboer, 1999). Os estudos pré-clínicos, que permitem melhor controle sobre as variáveis experimentais, mostram que a administração intracerebroventricular (i.c.v.) de CRH induz aumento de comportamento ansioso, refletido por maior expressão de comportamento de congelamento) e supressão de consumo alimentar, ambos manifestados em ambientes novos (Britton et al., 1982; Sutton et al., 1982). A estimulação de ambos CRHR1 e CRHR2 resulta em comportamento do tipo-ansioso em roedores, embora o CRH tenha um efeito mais potente junto ao CRHR1 (Steckler e Holsboer, 1999). Entretanto, estudo com animais *knockdown*, induzido pelo uso de antisense para CRHR1 ou CRHR2 demonstra que apenas a inibição do CRHR1 produz efeito ansiolítico (Heinrichs et al., 1997; Liebsch et al., 1999), enquanto que antisense para CRHR2 aumenta o tempo de imobilidade no teste do nado forçado (TNF), que é interpretado como aumento do comportamento do tipo-depressivo. Por outro lado, a estimulação do CRHR2 parece inibir o desamparo aprendido neste teste comportamental, promovendo aumento do tempo de natação (Liebsch et al., 1999). Ademais, antagonistas de CRHR1 revertem diversas alterações comportamentais compatíveis com ansiedade, em animais como, por exemplo, abstinência por álcool (Baldwin et al., 1991) ou por lorazepam (Skelton et al., 2007), redução de visitas ao braço aberto do labirinto em cruz elevado (LCE) induzida por modelo de derrota social (Liebsch

et al., 1995; Skutella et al., 1994) e inibição do lambar punido no teste de conflito, no qual o animal privado de água enfrenta o conflito entre beber e receber um leve choque na língua e suprimir a ingestão de líquido (Britton et al., 1986). A confirmação do envolvimento dos CRHR1 com comportamento ansioso é também observada em estudos com animais *knock out* para esse receptor, que apresentam menor latência para entrar e maior tempo de permanência no compartimento iluminado (e, portanto, aversivo) no teste de transição da caixa claro-escuro (Timpl et al., 1998) e maior número de entradas e tempo de permanência nos braços abertos do LCE (Smith et al., 1998). Coletivamente, os estudos sugerem, fortemente, a existência de relação causal entre desregulação do sistema encefálico de CRH (não apenas o NPV e o eixo HPA) e neurobiologia dos transtornos afetivos e ansiosos.

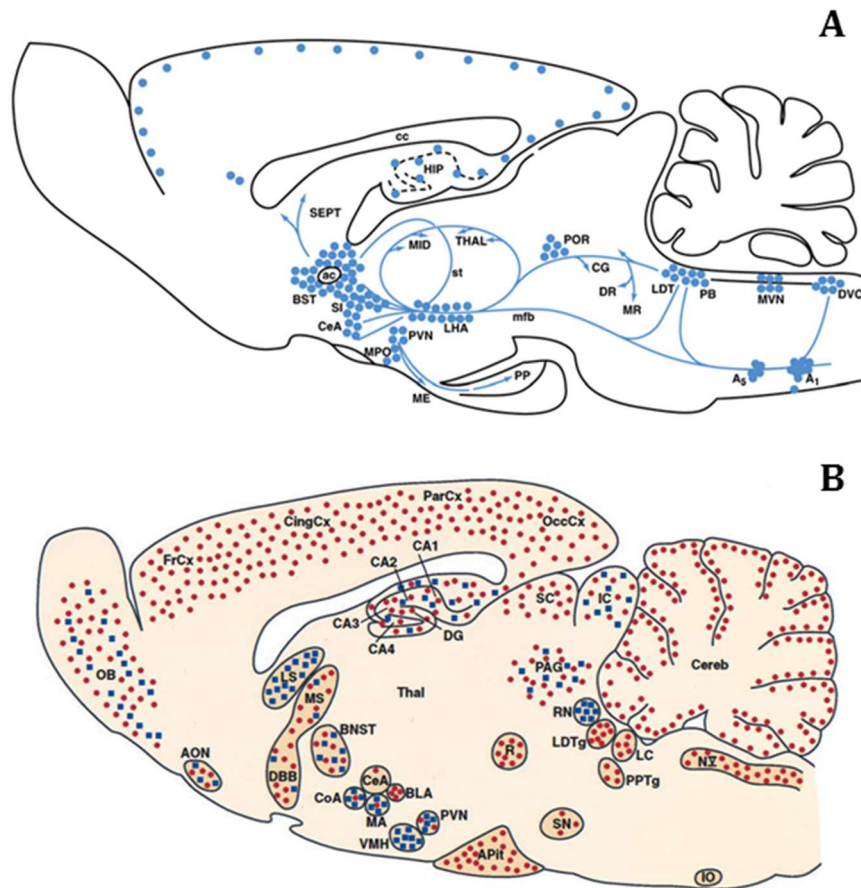


Figura 3.4 – Sistema do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) no encéfalo de ratos. (A) Estruturas em que foi detectada imunorreatividade para CRH (Koob, 2008). (B) Localização dos CRHR1 (pontos vermelhos) e CRHR2 (quadrados azuis). Notar a distribuição diferencial dos receptores, com pouquíssima sobreposição, exceto no núcleo olfativo anterior (AON), CA1, CA2, CA3, CA4 e giro denteado (DG) no HPC, septo medial (MS), banda diagonal de Broca (DBB), substância cinzenta periaquedutal (PAG), núcleos da amígdala (AMI): amígdala basolateral (BLA), CeA, núcleo medial da amígdala (MA), núcleo da *stria terminal* (BNST) e NPV (Steckler e Holsboer, 1999).

3.2. Características da ação dos glicocorticoides

Além das ações metabólicas mencionadas anteriormente, os GCs também são importantes reguladores do desenvolvimento do SNC e da plasticidade neuronal, influenciando praticamente todos os aspectos do desenvolvimento neuronal, como a neurogênese, sinaptogênese, morfologia dendrítica e morte celular (McEwen, 2000). Suas ações são mediadas pela ligação a dois receptores intracelulares, cuja clonagem revelou serem idênticos aos MR presentes nos rins e aos GR presentes no fígado (Arriza et al., 1988; Fuxe et al., 1985). Ao se ligarem aos seus receptores, os GCs induzem alterações conformacionais que resultam na dissociação desses receptores das proteínas chaperonas, formando dímeros que se ligam ao DNA iniciando, assim, a transcrição gênica. Dessa forma, a tradução do RNAm de algumas proteínas é afetada, produzindo mudanças nas características das membranas celulares e na homeostasia metabólica

(Joëls and de Kloet, 1994). Entre essas alterações de membrana, é particularmente relevante o aumento da condutância iônica, especialmente para o íon cálcio (Ca^{2+}) (Joëls and de Kloet, 1992), que está intimamente relacionado à liberação de neurotransmissores na fenda sináptica (Augustine, 2001).

Por serem receptores envolvidos com a regulação da transcrição de genes, a ação dos MR e GR apresenta grande latência para que seus efeitos sejam observados (de minutos a horas), além de longa persistência desses efeitos em processos fisiológicos e comportamentais (de Kloet et al., 1993; Sapolsky et al., 2000). Entretanto, a ação neuronal dos GCs é rápida (de alguns segundos a 5 min), como a inibição de correntes dependentes de N-metil-D-aspartato (NMDA), inibição de correntes induzidas por adenosina tri-fosfato (ATP), inibição de correntes de Ca^{2+} , estimulação da captação de glutamato (Groeneweg et al., 2012), que justifica a proposição da existência de receptores de membrana responsivos a esses esteroides (Makara and Haller, 2001).

Vale lembrar que aproximadamente 90% de CORT circula no sangue, ligada à globulina de ligação aos corticosteroides (CBG, acrônimo de *corticosteroid binding globulin*) e somente a porção livre tem a capacidade de se ligar aos MR e GR intracelulares. A CBG é uma proteína com alta afinidade por CORT e é regulada pela concentração do hormônio em uma razão diretamente proporcional. Sua função é de tamponar os tecidos-alvo contra os efeitos deletérios de altas concentrações de CORT, regulando a disponibilidade do hormônio em sua forma livre (Breuner and Orchinik, 2002).

Os MR e GR apresentam afinidades diferentes pelos GCs, de tal forma que os primeiros possuem alta afinidade (cerca de 10 vezes maior do que os GR) por seus ligantes naturais, GCs e aldosterona, enquanto que os GR possuem alta afinidade por ligantes sintéticos, como a dexametasona (DEXA). Devido a essas características, 80 a 90% dos MR estão ocupados durante o dia todo, enquanto que os GR são ocupados somente na presença de altas concentrações de CGs, ou seja, no pico do ritmo circadiano ou em resposta ao estresse (de Kloet et al., 1993). A distribuição desses receptores no SNC também é distinta, sendo que os MR estão concentrados no HPC, septo lateral e bulbo olfativo, onde se ligam fortemente aos GCs, e no órgão circuventricular, onde se ligam fortemente à aldosterona. Os GR, por sua vez, apresentam distribuição ubíqua e concentram-se no CPF, HPC, AMI, NPV, núcleo supra-óptico (NSO), LC e NDR e NMR (McEwen et al., 1969; Reul and de Kloet, 1986).

Por meio de sua ação sobre os dois receptores, os GCs atuam de maneira permissiva, preparando os sistemas de defesa do organismo para enfrentar um estressor, ou de maneira supressiva, limitando esses sistemas (Sapolsky et al., 2000). A estimulação dos MR, portanto, medeia os efeitos basais dos GCs, tais como manutenção da responsividade dos neurônios aos seus neurotransmissores, manutenção do ritmo circadiano de atividade do eixo HPA e da pressão arterial. Além disso, os GCs possuem ações permissivas sobre as enzimas digestivas, sobre a enzima que converte a NA em adrenalina na medula das glândulas adrenais (feniletanolamina-N-metiltransferase, PNMT), sobre o sistema imunológico, aumentando a migração de leucócitos para o local da infecção, e na plasticidade sináptica, com a redução do período refratário dos neurônios hipocampais (Lupien et al., 2009; Sapolsky et al., 2000). Por outro lado, ao agir em GR, os GCs atuam de forma supressiva, limitando diversas funções, entre as quais, utilização de glicose no cérebro, prejudicando a sobrevivência celular (Lupien et al., 2009), a plasticidade neuronal, o aprendizado e a memória, devido ao impacto negativo que altas e persistentes concentrações de GCs exercem sobre os neurônios hipocampais e sobre a própria atividade do eixo HPA em situações de estresse (Sapolsky et al., 2000).

Dada a natureza catabólica dos GCs, é essencial que sua secreção seja estritamente controlada, de modo que suas ações sejam manifestadas apenas durante o período em que são necessárias, ou seja, durante a vigência do estressor. Este controle fino na atividade do eixo HPA é feita, principalmente, mas não exclusivamente, pelos próprios GCs, em um típico mecanismo de *feedback* negativo (Figura 3.1), durante o qual diferentes vias, diretas e indiretas, em resposta aos estímulos físicos ou psicológicos, são recrutadas para limitar, em última instância, a ativação do NPV. As vias diretas incluem aquelas provenientes do núcleo do trato solitário (NTS, predominantemente noradrenérgicas e adrenérgicas), do NDR (predominantemente serotoninérgicas), de outros núcleos hipotalâmicos, do BNST (predominantemente GABAérgicas e glutamatérgicas). As principais projeções indiretas para o NPV originam-se em estruturas do sistema límbico, CPF, HPC, CeA e MA, subículo ventral e septo lateral, que confluem para BNST e para outros núcleos hipotalâmicos (Herman et al., 2003).

Como descrito acima, os principais receptores envolvidos com o mecanismo de retroalimentação negativa são os GR, embora os MR também sejam necessários para a regulação ótima. Assim, em roedores, baixas concentrações de CORT inibem a secreção de ACTH pela manhã (correspondendo ao vale do ritmo circadiano de secreção da CORT),

enquanto que no período noturno (pico de atividade do eixo HPA) altas concentrações de CORT, que resultam em ocupação de ambos MR e GR, são necessárias para que ocorra a inibição do eixo (Bradbury et al., 1994).

As concentrações circulantes de GCs influenciam o desempenho de diversos sistemas, em consequência da proporção de ocupação dos receptores MR e GR. Como se observa na Figura 3.5, a atividade desses sistemas fica aquém do ótimo quando ocorre hiposecreção de GCs (baixa ocupação de MRs e sem ocupação de GRs) ou hipersecreção de GCs (saturação de ambos os receptores), em um padrão dose-resposta em forma de U-invertido. Embora essa hipótese tenha sido inicialmente elaborada para explicar a influência bimodal dos GCs na memória espacial, hipocampo-dependente (de Kloet et al., 1999; Pugh et al., 1997; Salehi et al., 2010), outras funções também são determinadas por esse padrão, como a atividade do sistema imunológico (Schobitz et al., 1994; Wiegers et al., 1993) e o tempo de SREM (Born et al., 1991; Garcia-Borreguero et al., 2000; Machado et al., 2008; Marinesco et al., 1999).

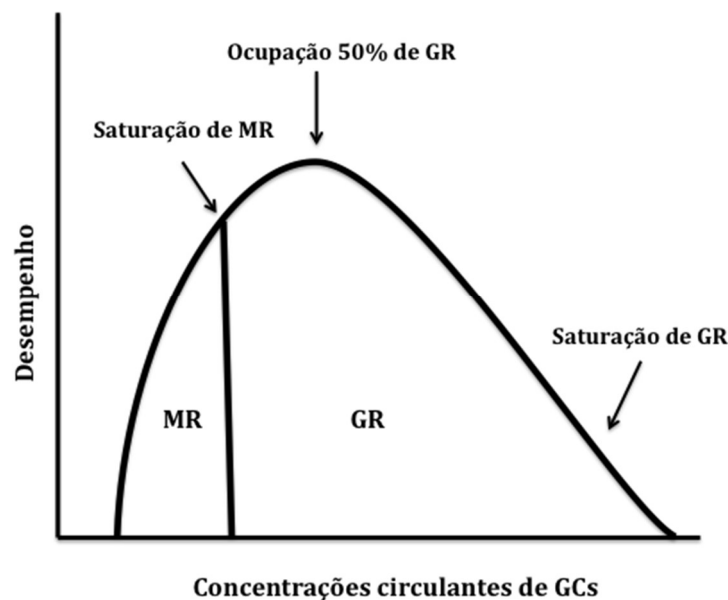


Figura 3.5 - Hipótese da razão de ocupação MR/GR para explicar a associação entre as concentrações circulantes de GCs e desempenho da memória (de Kloet et al., 1999). De acordo com essa hipótese, o desempenho máximo da memória é obtido quando os MR estão saturados e 50% dos GR estão ocupados (adaptado de (Lupien et al., 2007)).

3.3. Ontogênese e diferenças sexuais da resposta de estresse

A atividade basal e a resposta do eixo HPA ao estresse passam por profundas mudanças ao longo da vida. Essas alterações são decorrentes do desenvolvimento e amadurecimento de conexões neuronais, amadurecimento da atividade das glândulas adrenais, e dependem da influência dos hormônios sexuais e do repertório comportamental do indivíduo. A seguir será apresentado um breve relato do desenvolvimento ontogenético e a influência dos hormônios sexuais nas respostas de estresse do eixo HPA.

3.3.1. Período peri-natal

Existem numerosas evidências de que a atividade do eixo HPA tem início na fase fetal, em seres humanos, ovelhas (principal espécie estudada nessa fase da vida) e em ratos. Os estudos clássicos mostram que em ovelhas, o aumento da secreção de ACTH e cortisol pelo feto desencadeia o parto. Em ovelhas, intervenções que prejudicam a liberação desses hormônios, tais como lesão do NPV, da hipófise, do pedúnculo hipofisário ou das glândulas adrenais do feto, retardam o nascimento, assim como o tratamento da mãe com ACTH ou CORT precipita o parto. No período mais tardio do desenvolvimento fetal de ovelhas também se observa aumento do RNAm para CRH, mas não para AVP. Porém, ensaios *in vitro* demonstram que as células produtoras de ACTH são responsivas à AVP. As glândulas adrenais respondem ao ACTH com aumento da síntese de CORT, à medida que o ACTH regula positivamente a afinidade de seus próprios receptores e da resposta da adenilato ciclase (Challis et al., 2001).

Em fetos de ratos, os neurônios do NPV, produtores de CRH são detectáveis no dia 18 de vida intra-uterina, enquanto que a atividade do ACTH inicia-se entre os dias 17 e 18. O sistema de *feedback* negativo já é funcional na última semana de prenhez, uma vez que administração materna de GCs sintéticos reduz as concentrações de CRH e ACTH no NPV e hipófise, respectivamente. Nesta espécie também está comprovada a importância de CORT para o desencadeamento do parto e da adrenalina no momento do nascimento (Boudouresque et al., 1988; Chatelain et al., 1988; Chatelain et al., 1980; Chatelain et al., 1990; Dupouy et al., 1975). Embora no dia pós-natal (DPN) 1 as glândulas adrenais do filhote sejam plenamente capazes de secretar CORT em resposta a administração de ACTH (semelhante ao padrão do animal adulto), essa propriedade se perde a partir do DPN 4, até aproximadamente o DPN 14 (Figura 3.6) (Witek-Janusek, 1988).

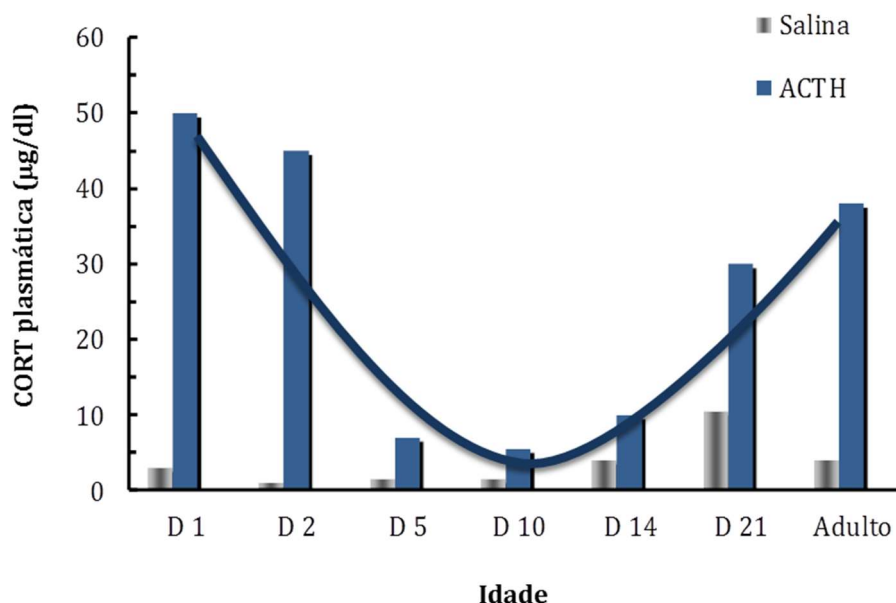


Figura 3.6 – Período de hiporresponsividade ao estresse, representado pela insensibilidade das glândulas adrenais ao seu hormônio trófico, ACTH. Notem a diminuta resposta de CORT à administração de salina durante este período e um aumento substancial no dia 21 (Modificado de Witek-Janusek, 1988).

Esse período de reduzida sensibilidade das glândulas adrenais ao seu hormônio trófico é conhecido como período de hiporresponsividade ao estresse (PHRE) (Schoenfeld et al., 1980) e não está restrito às glândulas adrenais, uma vez que todos os componentes do eixo HPA apresentam menores concentrações de seus mediadores (CRH, AVP e ACTH) que aumentam ao longo do desenvolvimento pós-natal (Grino et al., 1989; Walker et al., 1986). Entretanto, estudos mais recentes mostram que após estressor leve ou moderado ocorre aumento do RNAm para CRH (Dent et al., 2000b) e do RNAm para AVP (Dent et al., 2000a) no NPV nos dias pós-natais (DPNs) 6, 12 e 18. Esse aumento ocorre gradualmente ao longo das idades avaliadas, indicando que, embora o hipotálamo esteja sujeito ao amadurecimento de sua resposta de estresse, a mesma já existe no início da vida. Quanto às concentrações de CGB, estas também são extremamente baixas nesse período e só se elevam a partir do DPN 12 (Henning, 1978; Viau et al., 1996), de modo que mesmo que as concentrações de CORT sejam muito baixas, virtualmente o hormônio encontra-se quase que totalmente livre. Este aspecto fisiológico incitou a proposição de uma das primeiras hipóteses apresentadas para explicar a existência deste período: aumento da eficiência do *feedback* negativo da CORT (Walker et al., 1990; Walker et al., 1991). Porém, essa hipótese é irreconciliável com os achados que demonstram que quando o filhote é capaz de responder a algum estressor, as concentrações de ACTH e CORT permanecem elevadas

por, pelo menos 2 h, tempo muito superior ao necessário para que os valores hormonais retornem ao basal, em animais adultos (Suchecki et al., 1993a; Suchecki et al., 1995; van Oers HJ et al., 1997). Um estudo realizado para examinar a ontogênese do sistema de *feedback* negativo mostra que a injeção de CORT em filhotes aos 9 e 12 dias de vida, submetidos à ADX, não restaura as concentrações de ACTH (que estão muito altas, devido à remoção das glândulas adrenais) aos valores de filhotes controle, submetidos ao procedimento da cirurgia. Estes resultados confirmam a hipótese de que este sistema não está plenamente funcional durante essa fase da vida (van Oers et al., 1998b).

Estes aspectos, intrínsecos à fisiologia do neonato, não explicam porque um sistema plenamente funcional durante o final do período fetal e nos primeiros dias do período pós-natal torna-se ineficiente e silencioso. O que mudou entre essas duas fases da vida? A resposta é simples: o nascimento, e com ele, os cuidados maternos. De fato, diversas evidências demonstram que a presença materna regula a atividade do eixo HPA de maneira inibitória e que cuidados maternos específicos regulam diferentes componentes deste eixo neuroendócrino. Assim, filhotes afastados da mãe por 24 h exibem uma resposta robusta de ACTH a uma injeção de salina (Suchecki et al., 1993a) a não ser que recebam estimulação ano-genital durante o período de separação de suas mães (Suchecki et al., 1993b). Este comportamento maternal também inibe a atividade do NPV (van Oers et al., 1998c), indicando que o componente central do eixo HPA é tonicamente inibido pela estimulação ano-genital. Por outro lado, filhotes mantidos com mães incapazes de amamentar (devido à ligadura dos ductos mamários) apresentam aumento das concentrações basais e estimuladas por estresse de CORT (Cirulli et al., 1992), enquanto que filhotes separados de suas mães por 24 h, mas alimentados durante este período apresentam baixas concentrações de CORT, porém mais elevadas do que as dos filhotes mantidos com suas mães (Rosenfeld et al., 1993; Suchecki et al., 1993b). Estes resultados indicam que a amamentação é o principal comportamento maternal inibidor da secreção de CORT.

A alimentação estimula uma série de sinais hormonais periféricos relacionados ao controle central da fome e saciedade, tais como a leptina, hormônio secretado pelos adipócitos e que atua como um sinal de saciedade, e a GHrelina, hormônio liberado pelo estômago e que sinaliza a fome (Klok et al., 2007). Uma vez que a separação dos filhotes de suas mães envolve a suspensão de alimentação, esses sinais poderiam participar, ao menos em parte, do controle da sensibilidade das glândulas adrenais. Em situações de

jejum, a secreção de leptina é inibida e a de GHrelina, estimulada (Klok et al., 2007). Os resultados dos pouquíssimos estudos realizados com essa finalidade indicam que sinais metabólicos periféricos participam, pelo menos parcialmente, da manutenção da refratariedade das glândulas adrenais ao ACTH. Em ratos neonatos, a administração de leptina inibe a esteroidogênese induzida por ACTH (Salzmann et al., 2004), enquanto que em camundongos neonatos, administração de glicose ou de antagonista do receptor de GHrelina inibem, parcialmente, a secreção de ACTH e CORT induzida pela ausência materna (Schmidt et al., 2006). Esses achados poderiam indicar que o mediador comum do PHRE é a produção reduzida de ACTH, que seria insuficiente para estimular seus receptores de membrana e desencadear a atividade adrenocortical. Para testar essa hipótese, realizamos um estudo no qual filhotes de ratos receberam duas administrações de ACTH ou de salina (controle da injeção) no DPN 11, às 10:00 h e às 16:00 h e foram eutanasiados às 10:00 h do dia seguinte (DPN 12), para coleta de sangue e das glândulas adrenais. Um grupo adicional de filhotes que não foi manipulado de nenhuma forma serviu como grupo CTL e foi eutanasiado no mesmo horário e idade do que os outros dois grupos. O plasma foi utilizado para a determinação das concentrações de ACTH e CORT e os resultados mostraram que embora os filhotes tratados com ACTH apresentassem aumento das concentrações plasmáticas do peptídeo e aumento das glândulas adrenais, não diferiam do grupo CTL quanto às concentrações plasmáticas de CORT, demonstrando que a produção reduzida de ACTH não é a mediadora do PHRE (Faturi et al., 2010).

Assim sendo, para que o SNC e o organismo se desenvolvam plenamente, é primordial que concentrações baixas e estáveis de CORT sejam mantidas. O aumento das concentrações deste hormônio catabólico prejudica o desenvolvimento adequado do filhote (Ballard et al., 1979; Sawano et al., 1969)(para revisão, ver (Rosenfeld et al., 1992)) e a principal fonte reguladora dessa manutenção é a presença da mãe e seus comportamentos de cuidado para com os filhotes.

3.3.2. Adolescência

A adolescência marca a transição entre a infância e a vida adulta. Em ratos machos e fêmeas, a adolescência pode ser dividida em três estágios: a pré-puberdade/primeira adolescência, entre o DPN 21 (quando, geralmente, acontece o desmame) e o DPN 34; a adolescência mediana, entre os DPNs 34 e 46; a adolescência tardia, entre os DPNs 46 e 59 (Tirelli et al., 2003). A partir do DPN 60, os animais são considerados adultos, pois

nessa idade, atingem sua maturidade física e sexual (McCormick and Mathews, 2007).

Nessa fase da vida o SNC parece estar mais vulnerável a desenvolver patologias psiquiátricas desencadeadas por eventos estressores e tanto seres humanos quanto animais de laboratório exibem mudanças comportamentais relevantes. Além disso, a adolescência representa um período de intensa transformação do SNC, quando ocorrem as podas e amadurecimento das conexões neuronais (Andersen and Teicher, 2008) e amadurecimento de estruturas do SNC envolvidas com a emoção e memória, como o CPF, AMI e HPC (Giedd, 2004; Giedd et al., 1999; Giedd et al., 1996; Gogtay et al., 2004).

É nesta fase também que emergem as importantes diferenças sexuais que marcam a atividade basal do eixo HPA e de sua resposta ao estresse. Essas diferenças parecem estar intimamente relacionadas aos hormônios sexuais, uma vez que o estrógeno estimula, enquanto que a testosterona inibe, a atividade do eixo HPA (Lund et al., 2004; Viau and Meaney, 1991). Por volta do DPN 55, fêmeas apresentam maior conteúdo de CORT na adrenal e glândulas adrenais mais pesadas do que machos, embora as concentrações plasmáticas de CORT já sejam maiores no DPN 40 (Sencar-Cupović and Milković, 1976).

Em um estudo populacional realizado recentemente, com 1258 participantes, com idade média de 16,6 anos, foram analisados parâmetros periféricos da atividade basal do eixo HPA: concentrações plasmáticas de ACTH, CORT e CBG e concentrações salivares de CORT. Os resultados mostram que meninas apresentam menores concentrações de ACTH, mas maiores concentrações de CORT plasmático e salivar, a despeito de maiores concentrações de CBG do que meninos. Esses resultados sugerem que as glândulas adrenais de meninas são mais sensíveis ao ACTH do que as de meninos. Além disso, as altas concentrações salivares de CORT são reduzidas pelo uso de contraceptivos orais (Reynolds et al., 2013). Outro aspecto importante, revelado nesse estudo é que nesta idade, os valores de CORT salivar são semelhantes aos de adultos (Kudielka and Kirschbaum, 2003).

Em ratas adolescentes, uma sessão de 30 min de REST produz secreção mais prolongada de ACTH e CORT em comparação com ratas adultas. Ovariectomia (OVX) em ratas adolescentes reduz as concentrações de ACTH, mas não altera o padrão de resposta de CORT, indicando que nesses animais a sensibilidade das glândulas adrenais ao ACTH também está aumentada. Resultados semelhantes a respeito da relação entre as concentrações plasmáticas de ACTH e CORT foram obtidos em ratas adolescentes intactas

ou OVX, sugerindo que o aumento da sensibilidade das glândulas adrenais ao ACTH é independente dos hormônios sexuais (Romeo et al., 2004b).

Em ratos, as concentrações de CORT atingem valores adultos entre o desmame até o DPN 28, embora outros parâmetros da atividade do eixo HPA amadureçam mais tardiamente, como é o caso das células produtoras de ACTH (por volta de 2 meses de idade), ou mais precocemente, como é o caso do RNAm para GR (por volta de 2 semanas de vida) (McCormick and Mathews, 2007). A aplicação aguda de diversos estressores resulta em pico de resposta de estresse mais lenta e mais prolongada do que em adultos (Goldman et al., 1973; Gomez et al., 2004; Romeo et al., 2004a; Vázquez and Akil, 1993). Este padrão de resposta não se deve a diferenças na metabolização da CORT ou sensibilidade da adrenal ao ACTH ou mesmo a um retardo na resposta de ACTH (Vázquez e Akil, 1993), mas sim à imaturidade do sistema de *feedback* negativo da CORT (Gomez et al., 2002). Ademais, como as concentrações de CBG são semelhantes entre os adolescentes e adultos (Romeo and McEwen, 2006), o prolongamento da secreção de CORT nos adolescentes significa, em última instância, que os mesmos estão expostos ao hormônio bioativo por mais tempo.

Ao nível do SNC, 30 min de REST produzem maior ativação dos neurônios parvocelulares e aumento do RNAm para AVP no NPV em machos adolescentes (30 dias de vida) do que em adultos (60 dias de vida). Tanto a ativação do NPV quanto a expressão de AVP são inversamente proporcionais às concentrações circulantes de testosterona. Por outro lado, o RNAm para CRH no NPV e no CeA é maior em machos adultos do que em adolescentes após o estressor, indicando que tanto a função endócrina (NPV) quanto a de integração comportamental e autonômica de resposta ao estresse (CeA) do CRH são mais recrutados em animais adultos. Em fêmeas, não houve diferenças dependentes da idade para os parâmetros apresentados acima, exceto para as concentrações de CORT que foram maiores em adultas do que em adolescentes (tanto basal quanto pós-REST) e para o RNAm para CRH no NPV em situação basal (Viau et al., 2005). A resposta bem adaptada à exposição repetida ao mesmo estressor envolve a redução gradual da secreção de ACTH e CORT e da ativação do NPV (Herman, 2013; McEwen, 2006). Alguns estudos sugerem que essa capacidade não está plenamente desenvolvida na adolescência, de modo que machos no DPN 22, submetidos à REST por 30 min ao dia, por sete dias, apresentam valores hormonais semelhantes aos obtidos após uma única sessão de estresse; animais adultos, por outro lado, exibem habituação. Esses adolescentes também apresentam altas

concentrações de CORT livre, que são cerca de quatro vezes maior do que as de animais adultos, após o estresse crônico (Romeo et al., 2006).

Em uma série de estudos que utilizam um estressor social, no qual adolescentes machos e fêmeas são submetidos a 1 h de isolamento e retorno à gaiola-moradia com um novo morador do DPN 30 ao 45, mostram que as consequências são dependentes do sexo. Por exemplo, ocorre menor ganho de peso em machos, mas não em fêmeas, (McCormick et al., 2005). As fêmeas também parecem ser mais resistentes a esse estressor, quando avaliadas em relação ao comportamento do tipo-ansioso, pois ambulam mais e visitam mais os braços abertos do LCE, enquanto que tais comportamentos não são observados em machos (McCormick et al., 2008). Os resultados obtidos no LCE podem sugerir que fêmeas adolescentes estressadas exibem mais comportamento de risco, uma característica de vulnerabilidade para abuso de drogas (Gladwin et al., 2011). De fato, fêmeas adolescentes estressadas apresentam maior resposta de ambulação a uma baixa dose de nicotina e de anfetamina, confirmando a suposição de que são mais sensíveis à ação de drogas psicoestimulantes (McCormick et al., 2005). Em um estudo subsequente, o mesmo grupo utilizou o estressor social descrito acima e avaliou a resposta de CORT a 15 min de REST e o comportamento tipo-depressivo no TNF, imediatamente após o término do regime de estresse ou na idade adulta, respectivamente. Mais uma vez os resultados foram dependentes do sexo, sendo que na adolescência, os machos apresentaram uma resposta muito mais intensa de CORT do que fêmeas, enquanto que na idade adulta, as fêmeas apresentaram maior tempo de imobilidade, tanto em estro como em diestro, refletindo aumento do comportamento tipo-depressivo (Mathews et al., 2008).

Curiosamente, a exposição crônica de adolescentes no DPN 35 ou DPN 50 a estressores imprevisíveis, por duas semanas, produziu alterações orgânicas, como redução do ganho de peso corporal, aumento do peso relativo das glândulas adrenais e redução de tecido adiposo, que foram mais salientes nos animais expostos ao estresse na adolescência tardia do que no grupo exposto ao estresse na adolescência precoce; por outro lado o estresse crônico produziu aumento das concentrações de CORT e redução do RNAm para ocitocina no NPV apenas na adolescência tardia (Jankord et al., 2011).

O conjunto desses estudos mostra que a adolescência é um período sensível aos efeitos de estressores que podem, inclusive, perdurar até a idade adulta. De fundamental importância é o fato de que esses efeitos são dependentes do sexo.

3.3.3. Idade Adulta

A descrição da atividade do eixo HPA no adulto já foi apresentada no início desse capítulo, porém vale a pena ressaltar que as respostas de estresse dependem do estímulo, do tempo de exposição, de aspectos genéticos, história prévia e estratégias de enfrentamento. É importante manter em mente que, embora exposição crônica a estressores possa gerar alterações morfológicas e fisiológicas no SNC, estas não precisam ser consideradas, necessariamente, deletérias, pois podem ser reversíveis e necessárias às demandas decorrentes da situação atual. Entretanto, quando permanentes, essas alterações podem ser compreendidas como mal-adaptativas, devido ao alto custo fisiológico que impõem ao organismo.

Como exposto anteriormente, as porções simpática e neuroendócrina da resposta de estresse estão, reconhecidamente, vinculadas à mobilização e redistribuição de energia, aumento de oxigênio e nutrientes para os órgãos e tecidos, desempenhando funções metabólica e cardiovascular essenciais para a sobrevivência do indivíduo em situação de estresse (Sapolsky et al., 2000). Porém, a ativação e inativação desses sistemas dependem das características dos estímulos, como demonstrado em um estudo utilizando comportamento operante, no qual ratos foram canulados para permitir a coleta seriada de sangue e treinados a pressionar uma barra para obter alimento. Uma barra, retrátil, era introduzida na gaiola para sinalizar aos animais a disponibilidade de ração. As concentrações de NA, adrenalina e CORT foram determinadas antes e após a situação de recompensa (quando os ratos receberam o alimento após apertar a barra) ou de extinção (quando os ratos não obtinham alimento após apertar a barra). As concentrações de NA aumentaram após a obtenção da recompensa, enquanto que as de adrenalina apresentaram um pico 10 min após as tentativas frustradas de obter alimento, retornando ao basal em 30 min. Entretanto, as concentrações de CORT aumentaram em antecipação à apresentação da barra e permaneceram elevadas na situação de extinção. O que esses resultados indicam é que, por um lado, a NA pode estar associada à manutenção do comportamento ativo de pressionar a barra para obter alimento. Por outro lado, a adrenalina e a CORT são elevadas por situações frustrantes e imprevisíveis (de Boer et al., 1990). Outro bom exemplo do recrutamento desses sistemas ocorre em animais treinados ou não para nadar. Para um rato de laboratório, nadar pela primeira vez é uma situação imprevisível e incontrolável e, neste caso, observa-se intensa liberação de adrenalina e

CORT. Entretanto, quando o estímulo é repetido e o rato está treinado, ocorre adaptação dessas respostas e aumento da liberação de NA em resposta à natação (Scheurink et al., 1999), reforçando a interpretação apresentada no estudo de De Boer e colaboradores (de Boer et al., 1990). A comparação entre a secreção de CORT em ratos treinados e inexperientes mostra que o pico de liberação é semelhante para os dois grupos; porém, o retorno às concentrações basais é mais rápido nos animais treinados (Scheurink et al., 1999), indicando que a desativação do eixo HPA é um parâmetro mais importante do que o pico para indicar se a situação é estressora ou não. Resultado semelhante é observado entre ratos submetidos a um encontro agressivo. Durante 15 min de conflito ambos os grupos de animais apresentam um pico de secreção de CORT, porém, os vencedores retornam aos valores basais em 60 min, enquanto que os perdedores mantêm elevada secreção hormonal por alguns dias (Schuurman, 1980).

A exposição crônica a estresse imprevisível (dois estressores por dia, por duas semanas) produz aumento do RNAm de CRH no NPV e redução da expressão gênica de MR e GR no HPC (regiões CA1 e giro denteado [GD]), no NPV e no córtex frontoparietal (Herman et al., 1995). Observa-se também aumento da expressão de RNAm para CRH no NPV, da secreção de CORT e de comportamento de imobilidade no TNF (Jankord et al., 2011), além de aumento do peso das glândulas adrenais e redução no ganho de peso corporal (Flak et al., 2012) e da sensibilidade das adrenais ao ACTH (Ulrich-Lai et al., 2006). Além desses efeitos periféricos, esse regime de estresse também produz aumento de Δ FosB, um marcador tônico de ativação neuronal, no CPF, nas porções pré e infralímbicas, no núcleo do trato solitário e no GD. Esta última estrutura também apresenta aumento de marcação no grupo submetido a 1 h REST sempre pela manhã (Flak et al., 2012). Curiosamente, as alterações induzidas por esse protocolo de estresse crônico imprevisível na atividade do eixo HPA são atenuadas pela oferta de soluções palatáveis (sacarina ou sacarose) durante a exposição ao estresse (Ulrich-Lai et al., 2007). Em um estudo com animais submetidos à privação de SREM (PSREM), observamos um fenômeno semelhante, com redução da secreção de ACTH e CORT quando soluções de sacarina ou sacarose foram ofertadas aos animais (Suchecki et al., 2003). Estes achados estão em concordância com a proposição de Mary Dallman de que a preferência pelo consumo de soluções palatáveis durante situações de estresse crônico têm o objetivo de fortalecer o *feedback* negativo da CORT e, conseqüentemente, reduzir a atividade do eixo HPA (Dallman et al., 2003).

Este protocolo é efetivo para induzir comportamento do tipo-depressivo, na medida em que ocorre redução da preferência dos animais por solução de sacarose, um sinal de anedonia ou falta de prazer. Esse comportamento é considerado uma alteração primordial na depressão e pode ser replicado em modelos animais (Nestler and Hyman, 2010) e é sensível a tratamentos antidepressivos clássicos, que restauram a preferência pela sacarose (Papp, 2012; Stein et al., 2009). Além disso, é útil para desvendar a neurobiologia da depressão e de tratamentos experimentais, como é o caso de um estudo sobre a eficácia da estimulação cerebral profunda, uma técnica que utiliza o implante de eletrodos no CPF ventromedial de ratos, em reverter o efeito anedônico do estresse crônico imprevisível e seu possível mecanismo de ação. A estimulação por duas semanas restaura a preferência dos animais por sacarose, porém esse efeito antidepressivo é perdido em animais com lesão do NDR, indicando que a serotonina (5-HT) é um mediador importante desse efeito (Hamani et al., 2012).

Uma importante consequência do estresse envolve alterações na neurogênese hipocampal. Este processo de plasticidade neuronal ocorre em maior ou menor grau ao longo da vida (Leuner and Gould, 2010), sendo que as três etapas desse processo, proliferação celular, diferenciação e sobrevivência dos novos neurônios, estão sujeitas a modificações produzidas por estresse, aprendizagem e enriquecimento ambiental. A neurogênese durante a idade adulta parece ser um fenômeno que ocorre em diversas espécies de mamíferos, incluindo ratos e camundongos (as espécies mais estudadas), cães, raposas, musaranhos, saguis, macacos e seres humanos (para revisão (Schoenfeld and Gould, 2012)). No rato, o pico de neurogênese das células piramidais ocorre na última semana de prenhez, enquanto que o de neurogênese das células granulares do GD acontece nas duas primeiras semanas de vida (Morgane et al., 2002; Schlessinger et al., 1975).

Efeitos de estressores agudos sobre a neurogênese são controversos, porém estressores psicológicos, como derrota social (Gould et al., 1997; Lagace et al., 2010) e odor de predador (Tanapat et al., 2001) produzem redução em todas as etapas do processo e é revertida pela ADX e reposição com baixas doses de CORT (Tanapat et al., 2001). Embora esses resultados apontem para um efeito causal entre altas concentrações de CORT e inibição da neurogênese, alguns estudos sugerem que o estímulo, e não necessariamente o resultado hormonal desse estímulo, é o fator determinante. Por exemplo, exercício físico (Ferreira et al., 2011), enriquecimento ambiental (Kempermann

et al., 2002; van Praag et al., 1999), experiência sexual, aguda ou crônica (Leuner et al., 2010) e aprendizado dependente de HPC (Leuner et al., 2006) induzem ativação do eixo HPA e, conseqüentemente, aumento das concentrações de CORT. Entretanto, todos estes estímulos resultam em aumento da neurogênese, não só pelo aumento da proliferação, mas também pelo aumento da sobrevivência neuronal. É interessante notar que esses resultados reforçam a ideia de que a ativação do eixo HPA pode servir para dar suporte ao comportamento, porém para que o estímulo seja considerado um estressor, é necessário que seja incontrollável e imprevisível (Capítulo 2). Especula-se que os possíveis mediadores desses efeitos positivos sobre a neurogênese sejam o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF, acrônimo para *brain derived neurotrophic factor*) liberado por exercício físico (Cassilhas et al., 2012) e ocitocina (Leuner et al., 2012).

Os efeitos de estressores crônicos são mais consistentes e demonstram que diferentes situações inibem a neurogênese, por reduzir a proliferação e sobrevivência neuronais. Tais conseqüências são observadas com a utilização de estressores sociais (Czeh et al., 2001; Czeh et al., 2007; Czeh et al., 2002), isolamento social (Evans et al., 2012), com REST crônica (Pham et al., 2003; Rosenbrock et al., 2005) e com estresse crônico moderado (ECM) (de Andrade et al., 2013; Oomen et al., 2007). Na maioria dos estudos citados, os autores relatam indução de comportamentos emocionais, do tipo-depressivo e/ou ansioso pelos estressores crônicos; em contrapartida, intervenções utilizadas para o tratamento da depressão, como antidepressivos tricíclicos ou inibidores seletivos da recaptação de serotonina (Czeh et al., 2001; Czeh et al., 2007; Kuipers et al., 2013; Tanti and Belzung, 2013), estimulação elétrica transcraniana (Czeh et al., 2002) ou compostos que reduzem as concentrações de CORT, como alopregnanolona (Evans et al., 2012) ou que bloqueiam GR, como a mifepristona (Oomen et al., 2007) reverterem os efeitos deletérios do estresse crônico na neurogênese hipocampal.

As diferenças sexuais que emergem na adolescência adquirem um caráter marcante na idade adulta, tanto em relação à resposta hormonal quanto às conseqüências morfológicas e comportamentais. Em roedores está bem demonstrado que fêmeas secretam mais ACTH (Faturi et al., 2010) e CORT do que machos, tanto em condições basais, como em resposta a estímulos estressores (Kawakami et al., 2007; Tiba et al., 2008b; Verma et al., 2010; Viau et al., 2005). Essas diferenças se estendem ao NPV, uma vez que fêmeas apresentam mais RNAm para o CRH em condição basal, e mais RNAm para AVP em resposta ao estresse do que machos (Viau et al., 2005). Em um estudo recente

sobre sinalização dos receptores para CRH presentes no LC, foram relatadas diferenças na sinalização e tráfego de CRHR1 entre machos e fêmeas, com maior acoplamento de CRHR1 à proteína G estimulatória e inabilidade do estresse de natação em induzir internalização desses receptores em fêmeas (Bangasser et al., 2010). Ademais, sob condições basais, os neurônios do LC de fêmeas são mais sensíveis ao CRH do que os de machos e apresentam maior taxa de disparos com doses menores do neuropeptídeo (Curtis et al., 2006).

Dada a importância dos esteróides sexuais para a resposta de estresse, é natural imaginar que haja alterações na secreção de ACTH e/ou CORT ao longo do ciclo estral. De fato, as concentrações basais desses hormônios não mudam, porém, em resposta ao estresse de REST por 20 min uma exuberante liberação de ACTH é relatada imediatamente após o estressor apenas em fêmeas no proestro, enquanto que o aumento nas concentrações de CORT é observado 30 min após o fim do estressor em fêmeas no proestro e estro (Viau and Meaney, 1991).

Ao contrário dos resultados consistentes observados em animais de laboratório, em seres humanos os achados são mais controversos. Em resposta ao exercício físico, não se observam diferenças sexuais; entretanto, maiores concentrações de CORT salivar são obtidas em homens, em resposta a estressores psicológicos como exame escolar e estressor psicossocial (*Trier Social Stress Test* - TSST), que consiste em um discurso de 5 min sobre um tema específico seguido de uma tarefa aritmética mental por 5 min (Kudielka and Kirschbaum, 2005) e mesmo em antecipação a esse estressor psicológico (Kirschbaum et al., 1992). Além disso, os valores plasmáticos de ACTH e CORT são semelhantes em resposta ao TSST aplicado pela manhã (entre 9:00 h e 10:00 h) ou à tarde (entre 15:00 h e 16:00 h); porém o CORT salivar é mais baixo no período da tarde (Kudielka et al., 2004b).

Consistente com os resultados obtidos em animais de laboratório, também se observa diferenças na secreção de CORT ao longo do ciclo menstrual. O TSST induz maiores concentrações de ACTH em homens, porém em relação às concentrações de CORT livre, as mulheres na fase luteal assemelham-se aos homens e ambos os grupos apresentam maiores concentrações salivares do que mulheres na fase folicular ou que fazem uso de contraceptivos orais (Kirschbaum et al., 1999). O dimorfismo sexual da reatividade do eixo HPA também parece ser influenciado pelo tipo de estressor. Enquanto homens apresentam maior reatividade (concentrações mais altas de ACTH e CORT) ao

TSST, mulheres na fase folicular apresentam maior reatividade à administração de naloxone, um antagonista opióide, que produz desinibição dos neurônios produtores de CRH (Uhart et al., 2006).

Em relação à neurogênese, as diferenças sexuais são surpreendentes, especialmente em vista da maior atividade basal e resposta do eixo HPA ao estresse em fêmeas do que em machos. Em geral, a proliferação e sobrevivência neuronais são menos afetadas por diferentes estressores em fêmeas do que em machos (Falconer and Galea, 2003; Westenbroek et al., 2004). A exposição a 2 h de REST por 12 dias causa redução da proliferação neuronal em machos e de sobrevivência neuronal em fêmeas (Hillner et al., 2013). Estes aspectos da neurogênese em fêmeas são ainda mais evidentes durante o proestro, quando as concentrações de estradiol estão altas e a produção celular é maior do que em machos ou fêmeas durante as fases de estro e diestro (Tanapat et al., 1999). Além disso, em resposta ao nado forçado por 15 min, ratas OVX apresentam maior tempo de imobilidade e redução da neurogênese hipocampal (proliferação, diferenciação e sobrevivência neuronal), enquanto que esses efeitos não são observados em ratas durante a fase de proestro (Vega-Rivera et al., 2013). Resultados semelhantes foram relatados com estresse de odor de predador, em que a reposição com estradiol em fêmeas OVX restaurou a proliferação e sobrevivência neuronais (Falconer e Galea, 2003). Estes aspectos estão contemplados na revisão publicada por (Pawluski et al., 2009).

Coletivamente, os estudos em animais adultos demonstram inequivocamente que ratos e comundongos fêmeas apresentam concentrações de ACTH e CORT basais e induzidas por estresse mais altas do que machos, enquanto o oposto parece ser verdadeiro para seres humanos. Extraordinariamente, o dimorfismo sexual da secreção hormonal não parece ter correlação com o dimorfismo sexual da neurogênese hipocampal, embora em machos, o aumento das concentrações de CORT decorrentes do estresse crônico tenha um impacto sobre esse fenômeno de plasticidade neuronal.

3.3.4. Envelhecimento

Os primeiros estudos sobre a resposta de estresse em ratos idosos relatavam o retardo no retorno das concentrações de CORT aos valores basais, em relação ao padrão de adultos jovens (Sapolsky et al., 1986), além de incapacidade de adaptação desses animais à exposição ao estresse por frio (4°C) durante 4 h (Sapolsky et al., 1983). Concentrações basais também encontram-se elevadas tanto no período diurno quanto

noturno (Sapolsky et al., 1983), embora a magnitude dessa elevação pareça depender da linhagem dos animais; ratos das linhagens Sprague-Dawley e Long Evans mostram as maiores diferenças nos valores de CORT entre jovens e idosos (Sapolsky, 1992). As concentrações basais de ACTH estão aumentadas, bem como o peso das glândulas adrenais (em valores absolutos e relativos ao peso corporal); enquanto que as concentrações de CBG estão marcadamente reduzidas. Em resposta a estressores agudos (ambiente novo ou ambiente pareado ao choque nas patas), mais uma vez, a principal diferença entre os animais idosos e os jovens é o retardo do retorno das concentrações de CORT ao basal, ou seja, redução da eficiência do *feedback* negativo, aumento das concentrações livres de CORT e redução da densidade de GR no hipocampo (van Eekelen et al., 1991). Alterações da sinalização do GR e de sua localização celular (redução de GR nuclear) são evidentes em ratos idosos que apresentam prejuízo de memória no labirinto aquático de Morris; porém em ratos idosos sem esse prejuízo, não há qualquer diferença em relação aos animais jovens (Lee et al., 2012).

Durante o envelhecimento saudável em seres humanos, ocorre redução dos hormônios anabólicos, testosterona, estradiol, DHEA, hormônio de crescimento, e aumento dos hormônios catabólicos, adrenalina, noradrenalina e cortisol (Maggio et al., 2013; Van Cauter et al., 2000). Embora existam diferenças sexuais bem determinadas, parece haver algumas controvérsias, possivelmente decorrentes de diferenças metodológicas e tamanho amostral. Por exemplo, Seeman e colaboradores (Seeman et al., 2001) mostraram igualdade nas concentrações basais de CORT salivar entre mulheres e homens jovens, enquanto que os valores de homens idosos eram mais altos do que dos outros grupos. Entretanto, em resposta a um desafio mental, o incremento das concentrações de CORT salivar foi significativamente maior em homens jovens e em mulheres idosas (sem diferença entre esses grupos). Porém, um estudo subsequente revelou resultados diferentes. Em resposta ao TSST, homens e mulheres jovens secretaram mais ACTH, embora os homens idosos tenham apresentado as maiores concentrações de CORT salivar. Neste estudo ficou demonstrado também, que mulheres jovens e idosas produzem as mesmas quantidades de CBG, enquanto que homens idosos apresentam significativa redução dessa proteína de ligação, indicando que estão mais sujeitos aos efeitos do CORT (Kudielka et al., 2004a).

Especula-se que essas alterações hormonais sejam, pelo menos parcialmente, responsáveis pelo declínio cognitivo e da qualidade de sono frequentemente observados

nessa população (Copinschi and Van Cauter, 1995; Lupien et al., 2005). Em um estudo de metanálise, van Cauter e colaboradores mostraram um aumento gradual das concentrações basais noturnas de CORT ao longo da vida. Isso significa que durante o período diurno não há diferenças nos valores hormonais, porém, no período noturno, quando esses valores devem atingir o mínimo, estão mais elevados a partir de 60 anos. Os autores apresentam a hipótese de que esta elevação das concentrações noturnas de CORT seja responsável pelo prejuízo no tempo de sono de ondas lentas (SOL) observado nesta faixa etária (Van Cauter et al., 2000). No entanto, essa relação também pode ser dependente do sexo, já que observamos que idosos saudáveis (cinco mulheres e sete homens) submetidos a duas noites de avaliação de sono por polissonografia e coletas de sangue para determinação de CORT exibiram pior qualidade de sono na primeira noite de avaliação (noite de habituação) do que na segunda. Na segunda noite, as mulheres apresentaram maior porcentagem de SOL do que os homens, porém todos os participantes despenderam menos tempo em SREM, em comparação aos achados da literatura em adultos jovens (Carskadon and Dement, 2011). As coletas de sangue foram realizadas às 8:00 h, 16:00 h e 23:00 h, na casa dos voluntários (3 meses após a avaliação do sono) e no laboratório de avaliação do sono, no 2º dia do protocolo experimental. Em comparação com as concentrações de CORT obtidas nas casas dos voluntários, os valores obtidos no laboratório foram maiores às 8:00 h e menores às 23:00 h (Carvalhaes-Neto et al., 2003).

Em relação ao efeito cognitivo decorrente do aumento da secreção de CORT, demonstrou-se em animais que a exposição crônica a GCs causa prejuízos cognitivos (Landfield et al., 1978) e atrofia do hipocampo (Landfield et al., 1981b), efeitos estes que são revertidos por ADX (Landfield et al., 1981a). Em seres humanos, Lupien e colaboradores (2005) demonstraram de maneira elegante que idosos saudáveis podem ser distribuídos em três grupos de acordo com a secreção de CORT, que foi frequentemente avaliada durante um período de três a seis anos: 1) aqueles que apresentam redução, 2) os que apresentam um leve aumento e 3) os que apresentam um aumento significativo das concentrações basais de CORT, em relação à primeira coleta. Somente os idosos do 3º grupo demonstraram prejuízos cognitivos e redução do volume hipocampal, enquanto que não se observou prejuízo nos indivíduos dos outros dois grupos e, inclusive, os do 1º grupo apresentaram aumento do volume hipocampal. Entretanto, nesta população de idosos com prejuízo cognitivo, manipulações

farmacológicas das concentrações de CORT, pela administração de metirapona, não produziram os mesmos efeitos observados em animais (Lupien et al., 2002), possivelmente, devido à cronicidade e manutenção prolongada das intervenções nos animais, que não podem ser realizadas nos seres humanos.

Nosso grupo (trabalho de Pós-Doutoramento de Juliana Nery de Souza-Talarico, dados não publicados) conduziu um estudo sobre o impacto da exposição não-ocupacional a metais pesados (Cobre [Cu], Zinco [Zn], Chumbo [Pb], Cadmio [Cd] e Selênio [Se]) sobre as concentrações basais e sobre a resposta de estresse de 128 idosos saudáveis (107 mulheres e 21 homens), com idade média de 65,9 anos (mínimo de 50 e máximo de 82 anos) e escolaridade média de 9,7 anos (mínimo de 4 e máximo de 25 anos). As concentrações diurnas de cortisol foram determinadas em amostras obtidas durante um final de semana (valores basais) e após o TSST (resposta de estresse), quando também foram realizados os testes de avaliação de desempenho cognitivo.

Os resultados mostraram que Pb e Cd tiveram um efeito modulador sobre a variação diurna das concentrações basais de CORT salivar (Figuras 3.7 e 3.8), enquanto que o Pb e o Cu modularam a resposta de estresse na amostra (Figuras 3.9 e 3.10).

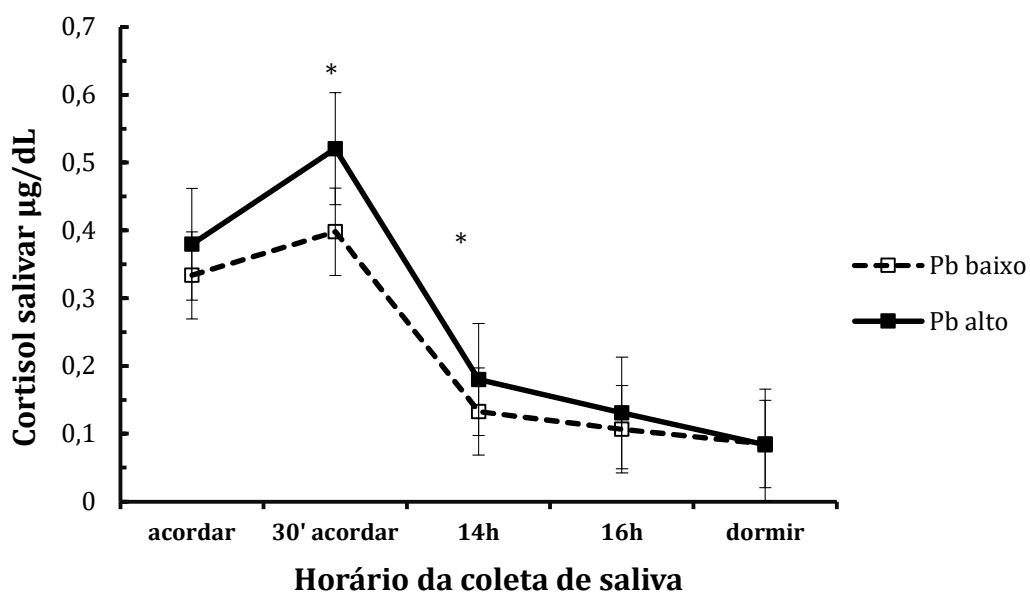


Figura 3.7 – Variação diurna das concentrações de CORT salivar em função das concentrações séricas de Pb. * - Diferença significativa entre os sub-grupos ($p < 0.05$). Valores são apresentados como média \pm erro padrão de 128 indivíduos.

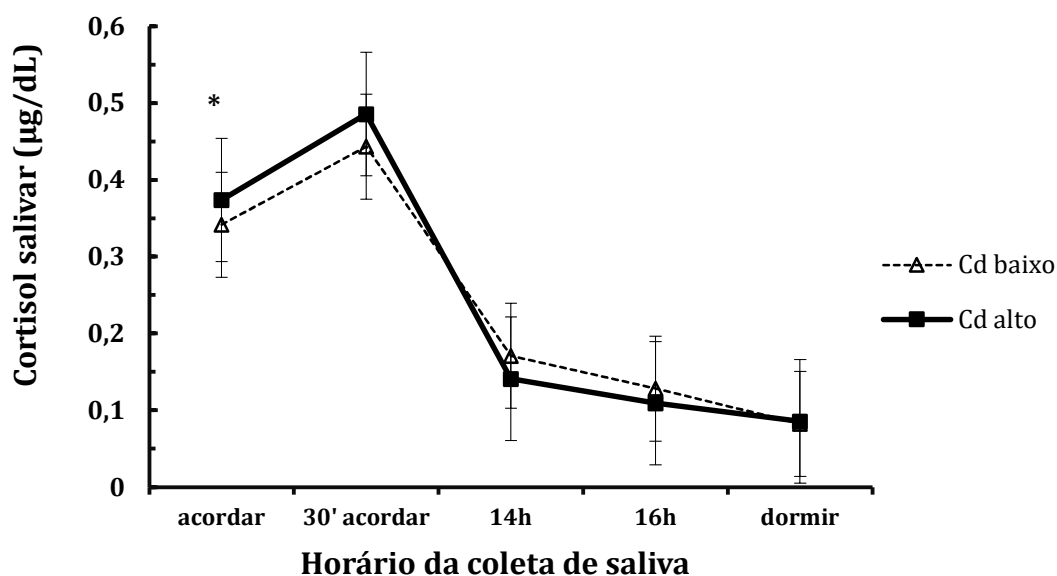


Figura 3.8 - Variação diurna das concentrações de CORT salivar em função das concentrações séricas de Pb. * - Diferença significativa entre os sub-grupos ($p < 0,05$). Valores são apresentados como média \pm erro padrão de 128 indivíduos.

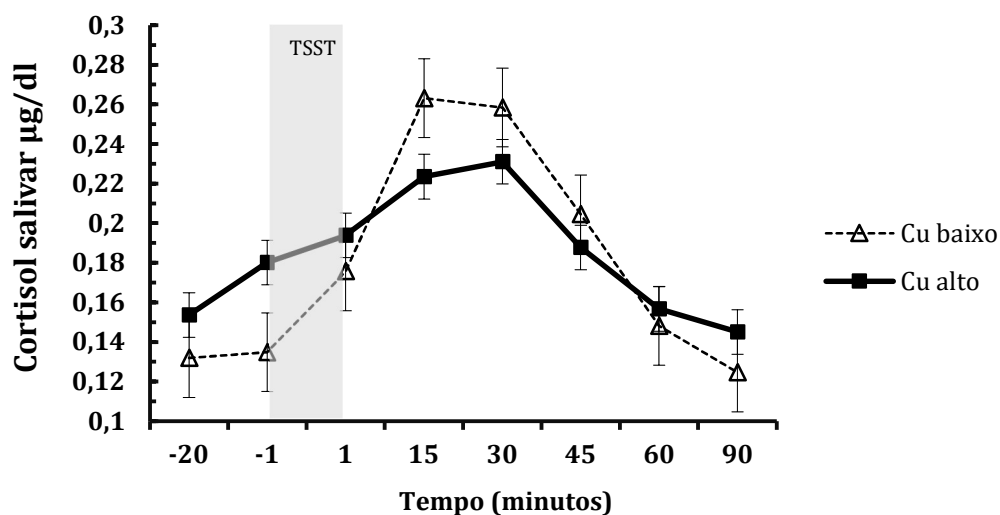


Figura 3.9 – Impacto das concentrações séricas de cobre (Cu) na resposta de cortisol salivar de idosos ao *Trier Stress Social Test* (TSST, indicado pela barra cinza). Houve uma tendência a diferença significativa aos 15 min após o teste. Valores são apresentados como média \pm erro padrão de 128 indivíduos.

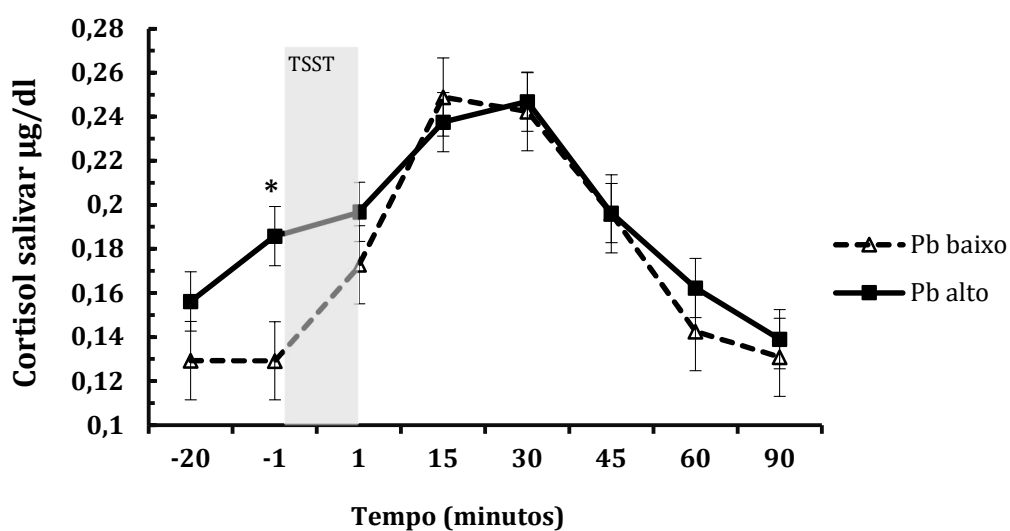


Figura 3.10 – Impacto das concentrações séricas de chumbo (Pb) na resposta de cortisol salivar de idosos ao *Trier Stress Social Test* (TSST, indicado pela barra cinza). * - Diferente do respectivo sub-grupo Pb baixo; $p < 0.05$. Valores são apresentados como média \pm erro padrão de 128 indivíduos.

Observamos também um resultado interessante a respeito da influência do estresse sobre o desempenho de memória em nossa amostra. Como pode ser visto na Figura 3.11, o TSST prejudicou a evocação no teste de pares de palavras.

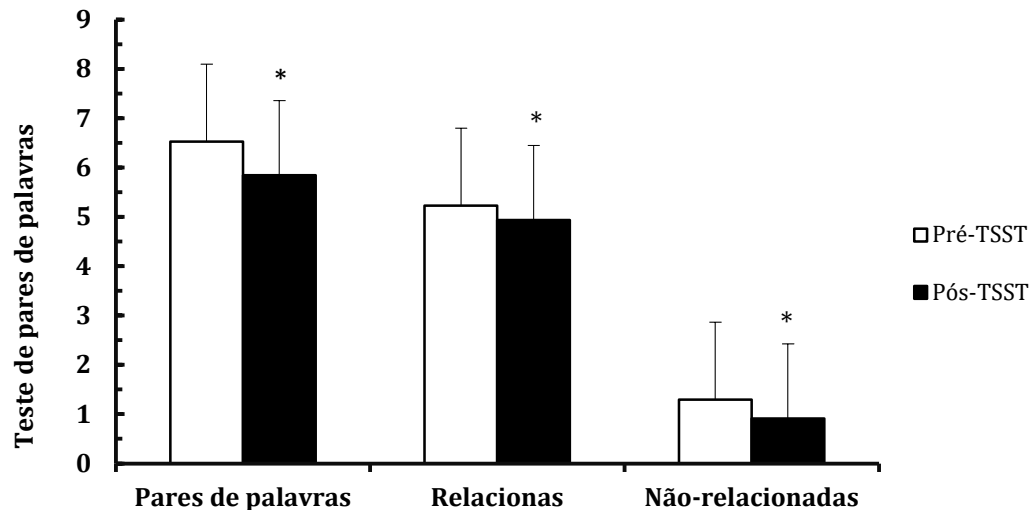


Figura 3.11 - Médias dos escores do teste Pares de Palavras (total, palavras relacionadas e não relacionadas) antes e após exposição ao evento estressor (TSST). * Diferença significativa ($p < 0,05$, Teste t de Student, pareado). Os valores estão expressos em média \pm erro padrão de 128 indivíduos.

Entretanto, devido à grande variabilidade intra-grupo, fizemos uma avaliação da reatividade da resposta de estresse (valores pós-TSST – valores pré-TSST). Essa estratégia revelou claramente que os indivíduos mais reativos ao TSST apresentaram pior desempenho na memória imediata (pré-TSST) e tardia (15 min após-TSST, Figura 3.12).

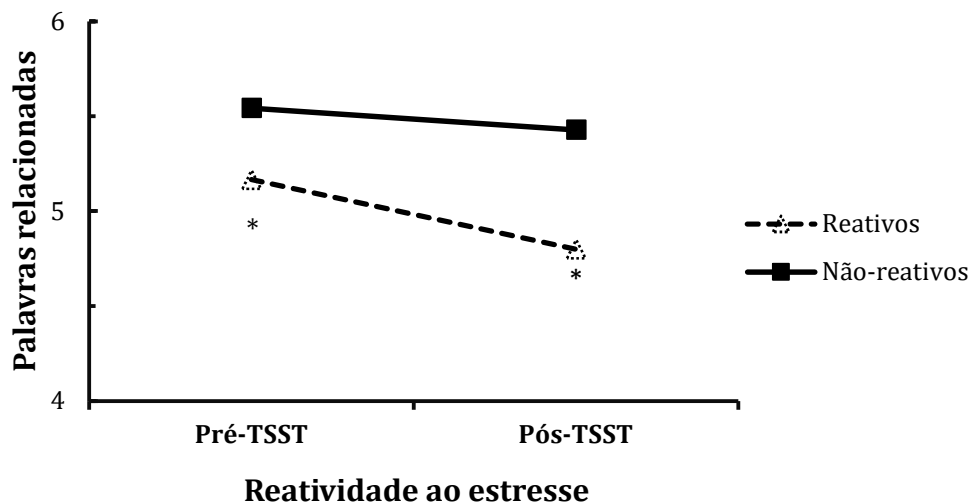


Figura 3.12 – Desempenho no Teste de Pares de Palavras, evocação de palavras relacionadas, em função da reatividade ao TSST. Pré-TSST refere-se à evocação imediata e Pós-TSST, à tardia. * - Diferença entre os sub-grupos ($p < 0,05$, MANOVA).

Portanto, os resultados obtidos com seres humanos e animais apontam para o fato de que o aumento das concentrações de CORT e o declínio cognitivo não são fatalidades do envelhecimento, mas que estão intimamente relacionadas.

4. O Estresse Perinatal e suas Consequências

Nothing is written in stone

Seymour Levine²

2. N.A. “Nada está escrito em pedra” ou “Como os resultados nunca cansam de nos surpreender” (D.S.)

A resiliência ou vulnerabilidade às doenças desencadeadas por eventos estressores é resultado de uma interação dinâmica entre a carga genética e o ambiente (Figura 4.1). O ambiente pode modificar a trajetória do desenvolvimento, do ponto de vista ontogenético, desde o período embrionário, passando pelo período neonatal ou infância e adolescência, períodos que representam “janelas de vulnerabilidade”, dada a intensa estruturação do SNC. A programação do desenvolvimento pode ser alterada por eventos estressores ou traumáticos impostos durante esses períodos.

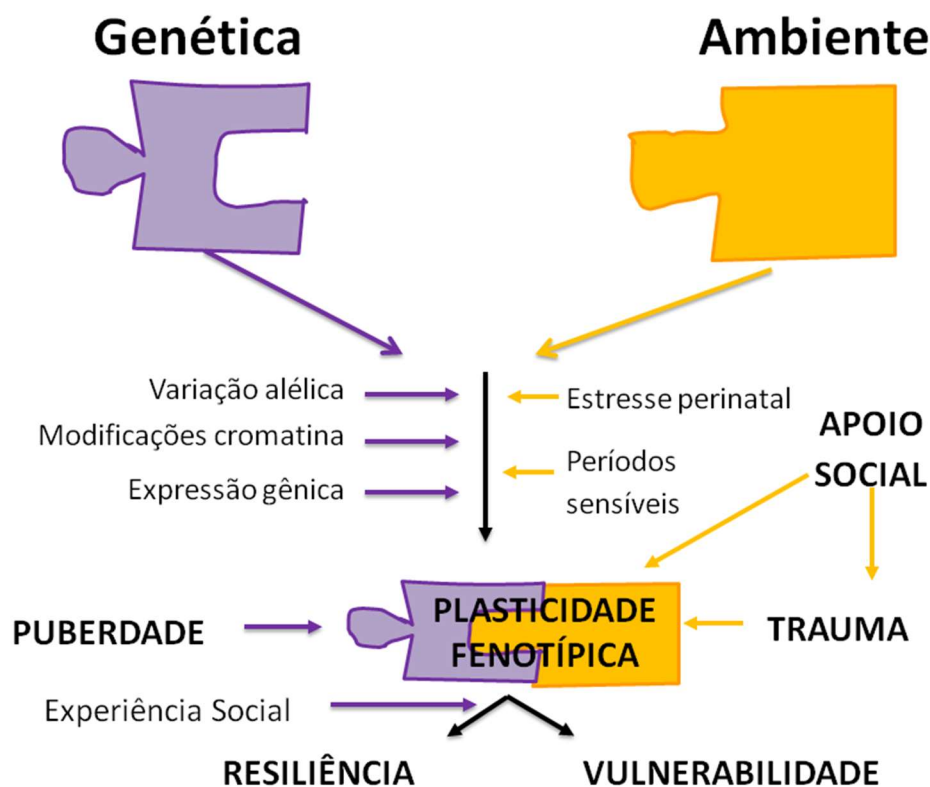


Figura 4.1 – Modelo da interação entre a influência genética e a ambiental na determinação da trajetória do desenvolvimento de resiliência ou vulnerabilidade às doenças desencadeadas pelo estresse (Modificado de (Plotsky et al., 1998)).

A visão corrente sobre o estresse perinatal (pré e/ou pós-natal) é de que este evento é um dos mais robustos fatores de risco para o desenvolvimento de doenças psiquiátricas em seres humanos e os modelos animais de ansiedade e depressão têm confirmado essa previsão (Caldji et al., 1998; Heim and Nemeroff, 2001; Plotsky et al., 1998; Tyrka et al., 2008). Essa “hipótese acumulativa do estresse” pressupõe que experiências aversivas na infância predispoem os indivíduos a serem mais vulneráveis a desafios aversivos na idade adulta de modo que o acúmulo de eventos estressores resulta em piores consequências.

Entretanto, alguns resultados levaram estudiosos a propor hipóteses alternativas para explicar a resiliência que muitas vezes é observada em indivíduos submetidos a estressores moderados durante a infância. Uma delas é conhecida como hipótese “*match/mismatch*” que propõe que eventos estressores na infância desencadeiam processos adaptativos capazes de habilitar o indivíduo a enfrentar melhor os desafios na idade adulta (Nederhof and Schmidt, 2012). A segunda hipótese, conhecida como efeito de inoculação (como se fosse uma vacina), parte do princípio que esses eventos na infância facilitam o desenvolvimento de estratégias efetivas de enfrentamento do estresse, levando à redução das reações ao estresse na adolescência e idade adulta. Essa hipótese já foi observada experimentalmente em seres humanos (Boyce and Chesterman, 1990; Edge et al., 2009), em macacos (Lyons and Parker, 2007; Lyons et al., 2009; Parker et al., 2006) e em roedores (Champagne et al., 2008; Hays et al., 2012). Neste capítulo apresentarei diversos estudos que descrevem as consequências imediatas e tardias do estresse pré-natal e neonatal dentro da perspectiva dessas duas hipóteses.

4.1. Efeitos do estresse pré-natal

Os efeitos do estresse pré-natal (EPN) em seres humanos são de difícil interpretação devido a inúmeros fatores incontrolláveis que incidem sobre a mãe, tais como aspectos genéticos, co-morbidades, fumo, consumo de álcool e/ou outras drogas, momento durante a gestação em que ocorreu o estressor e se o evento foi único ou repetido. De qualquer forma, existe uma vasta literatura sobre o aumento de casos de prematuridade e baixo peso ao nascimento em proles de mães expostas a estressores durante a gestação (para revisão, ver (Weinstock, 2001)). Estudos bem controlados, cujo estressor ocorreu em um período bem delimitado, mostram maior incidência de esquizofrenia, transtornos depressivos e neuróticos em uma amostra de 167 adolescentes cujas mães grávidas estavam de luto por seus maridos mortos durante a 2ª Guerra Mundial (Huttunen and Niskanen, 1978). Outro estudo com uma amostra maior (419 adultos) de filhos cujas mães estavam grávidas durante a invasão da Holanda pela Alemanha em 1940 mostra maior incidência de esquizofrenia, em ambos os sexos, se as mães encontravam-se no primeiro trimestre de gestação e apenas nos homens quando estavam no segundo trimestre. Essa diferença temporal é devida, provavelmente, ao desenvolvimento cortical mais lento em homens (van Os and Selten, 1998). Aumento da incidência de depressão e transtorno bipolar também foi detectado entre os filhos (independente do sexo) de mães grávidas no

segundo ou terceiro trimestres durante o Inverno da Fome na Holanda, entre 1944 e 1945 (Brown et al., 2000). Apesar desses achados fascinantes, existe uma dificuldade inerente aos estudos com seres humanos de determinar com exatidão o período em que o estressor aconteceu, a duração, os mecanismos envolvidos (já que os estudos são, em sua maioria, retrospectivos) e, principalmente, o impacto que o evento teve sobre a mãe (o evento pode ser agudo, mas suas consequências na psique da mãe podem perdurar por toda a gestação e além dela). Por isso, estudos controlados em animais permitem utilizar grandes amostras, definir melhor os efeitos temporais do EPN e os mecanismos envolvidos em suas consequências. Porém, para que estes estudos experimentais tenham valor translacional, é preciso conhecer a correspondência entre ratos e seres humanos quanto ao desenvolvimento do SNC (Tabela 1).

Com base nas informações apresentadas na tabela abaixo, pode-se observar que as estruturas cerebrais envolvidas com a resposta de estresse e com os comportamentos susceptíveis à ação dos hormônios do eixo HPA desenvolvem-se durante a 2ª e 3ª semanas de prenhez no rato e correspondem aos primeiros quatro meses de desenvolvimento fetal em seres humanos. A exceção a esta regra está restrita ao GD no HPC, cujo desenvolvimento se completa no período pós-natal em ratos e ocorre ao longo de um extenso período embrionário em seres humanos.

Tabela 1 – Comparação do desenvolvimento embrionário entre ratos e seres humanos

Região cerebral	Idade embrionária (E) ou pós-natal (DPN) em ratos	Idade fetal em seres humanos (em semanas)
<i>Neurônios motores somáticos</i>		
- Cervical	E12	4,1 – 5,2
- Lombo-sacral	E13	5,3 – 5,7
<i>Núcleos pontinos e medulares</i>		
- LC	E11 – E12	3,0 – 4,5
- Núcleos da Rafe	E13 – E15	4,1 – 5,7
- Formação reticular	E12 – E15	4,1 – 7,0
<i>Núcleos dopaminérgicos</i>		
- Substantia nigra compacta e reticulata	E13 – E15	5,3 – 7,0
- Área tegmentar ventral	E14 – E16	6,0 – 7,4
<i>Áreas Hipotalâmicas</i>		
- Pré-óptica lateral e medial	E12 – E14	4,1 – 6,6
- Sexual dimórfica	E15 – E19	6,7 – 11,9
<i>Núcleos hipotalâmicos</i>		
- Supra-óptico e NPV	E13 – E15	5,3 – 7,0
- Supraquiasmático	E14 – E17	5,8 – 7,9
- Ventromedial	E13 – E17	5,0 – 7,9
- Arqueado	E15 – E18	6,7 – 9,0
<i>Septo</i>	E13 – E17	5,3 – 7,9
<i>Áreas hipocâmpais</i>		
- CA ₁	E17 – E19	7,3 – 11,9
- CA _{3ab}	E16 – E19	7,0 – 11,9
- CA _{3c}	E17 – E20	7,9 – 14,9
- Giro Denteado	P3 – P15	19,0 – 32,0
<i>Estriado</i>		
- Caudado-putamen	E16 – E22	7,1 – 18,9
- Núcleo accumbens	E17 – E22	7,5 – 18,9
<i>Amígdala</i>		
- Área anterior	E13 – E15	5,3 – 7,0
- Área amígdalo-hipocampal	E16 – E19	7,1 – 11,9

Tabela adaptada de Weinstock et al., 2001.

Devido à ausência de conexões neuronais entre mãe e feto, os efeitos dos EPN são atribuídos aos GCs secretados pela mãe, que atravessam a barreira placentária, afetando a organização do SNC e de vários aspectos fisiológicos que resultam em doenças cardiovasculares, metabólicas, neuroendócrinas e afetivas (Cottrell and Seckl, 2009). Uma prova *bona fide* dessa relação é fornecida por estudos em que a prole adulta de mães estressadas por REST na última semana de prenhez apresenta deficiência do *feedback*

negativo de CORT em resposta a REST e redução da densidade de MR no hipocampo na idade adulta (Maccari et al., 1995; Morley-Fletcher et al., 2003). Entretanto se as mães são submetidas à ADX, tratadas com concentrações estáveis de CORT, e estressadas por REST, as proles adultas apresentam concentrações de CORT semelhantes à de proles de mães intactas não estressadas e menores do que a de proles de mães intactas estressadas (Maccari et al., 2003).

Um dos primeiros achados a respeito dos efeitos do EPN no comportamento de ratos foi a desmasculinização do comportamento sexual de machos expostos na 3ª semana de vida intra-uterina (lembrando que a prenhez em ratas tem duração de 21 a 22 dias) (Herrenkohl, 1983; Ward, 1972). Trabalhos subsequentes mostraram que comportamentos emocionais e afetivos são afetados pelo EPN, incluindo aumento de comportamento tipo-ansioso, com redução do tempo despendido nos braços abertos do LCE (Laloux et al., 2012; Vallée et al., 1997) e tipo-depressivo, refletido pela redução da latência para iniciar e pelo aumento do tempo despendido em imobilidade no TNF (Morley-Fletcher et al., 2003) e por alterações no padrão de sono, condizentes com a depressão em humanos, i.e., redução do tempo de SOL, aumento do tempo de SREM e mais fragmentação do sono (Dugovic et al., 1999).

Além dessas alterações, observamos que a utilização de PSREM como estressor durante a prenhez também tem impacto no comportamento da prole masculina adulta, que depende de quando foi imposta. Grupos diferentes de mães foram submetidas à PSREM por 96 h na 1ª, 2ª ou 3ª semanas de prenhez. As proles foram testadas, na idade adulta quanto à susceptibilidades à convulsão induzida por pentilenetetrazol (PTZ), um composto que age no sítio alostérico da picrotoxina, no complexo receptor do tipo A do ácido gama-aminobutírico (GABA_A), e quanto ao comportamento do tipo-ansioso no campo-aberto. O grupo EPN na 1ª semana ambulou menos no campo-aberto do que seu respectivo grupo controle (CTL), indicando redução do comportamento exploratório. O grupo EPN na 2ª semana, por sua vez, apresentou maior porcentagem de convulsões a uma dose subconvulsivante de PTZ do que o respectivo grupo CTL, enquanto que aquele submetido ao EPN na 3ª semana teve a menor porcentagem de convulsões. O fato de que fêmeas são menos susceptíveis à convulsão clônica induzida por PTZ sugere que além do comportamento sexual prejudicado, os machos EPN na 3ª semana também apresentam outras características feminilizadas (Suchecky and Palermo-Neto, 1991).

Mais recentemente avaliamos os efeitos da REST durante a 3ª semana de prenhez sobre o desenvolvimento neonatal das proles (do nascimento ao desmame, no DPN 21) e sobre o comportamento depressivo na idade adulta e a possibilidade de suplementação com ômega-3 (ou óleo de coco, que foi utilizado como controle do conteúdo de gordura na dieta) durante a prenhez e lactação de reverter os possíveis prejuízos produzidos pelo EPN. Independente da dieta ofertada às mães, aquelas submetidas à REST ganharam menos peso corporal durante a prenhez e apresentaram altas concentrações de CORT no 1º dia e no 7º dias de REST, indicando que não houve habituação ao evento. As ninhadas EPN apresentaram menor peso corporal ao nascimento sendo que as dietas ricas em gordura reverteram esse efeito no DPN 21; houve tendência do EPN em produzir retardo do reflexo postural, entretanto, o ômega-3 piorou e o óleo de coco melhorou esse parâmetro. Finalmente, tanto os filhotes machos quanto as fêmeas, EPN apresentaram hiperlocomoção, que foi revertida pela suplementação com ômega-3 (Borsonelo et al., 2011a). Quando adultas, as proles masculinas foram avaliadas no TNF e os comportamentos de natação, escalada (estratégias de enfrentamento ativo) e imobilidade (estratégia de enfrentamento passivo) foram quantificados; utilizamos esse teste como evento estressor para determinar as concentrações de CORT nesses animais. A primeira surpresa nos resultados foi a ausência de efeito pró-depressivo do EPN, uma vez que o tempo de imobilidade foi semelhante entre os animais CTL e EPN. Entretanto, a suplementação com ômega-3 aumentou significativamente o tempo de natação apenas no grupo EPN e ambas as dietas reduziram o tempo de imobilidade do grupo EPN, em comparação com a dieta padrão e com os respectivos grupos CTL. A segunda surpresa foi a menor liberação de CORT ao TNF nos animais do grupo EPN, comparados aos animais do grupo CTL, cujas mães foram alimentadas com dieta padrão. Além disso, as dietas contendo óleo de coco e ômega-3 reduziram a secreção de CORT no grupo CTL. Esses resultados podem ser decorrentes das frequentes manipulações realizadas para avaliar o desenvolvimento das proles que, associadas ao EPN e ao tratamento com ômega-3, podem aumentar a capacidade adaptativa ao estresse (Borsonelo et al., 2011b).

4.2. Efeitos do estresse neonatal

As principais adversidades enfrentadas por seres humanos durante a infância podem ser classificadas em três categorias: ruptura, privação e/ou abuso, sendo que, infelizmente, existe grande probabilidade de essas adversidades ocorrerem

simultaneamente ou em contiguidade. A ruptura envolve períodos prolongados de separação do principal cuidador, como morte dos pais, abandono ou remoção do lar. Privação é uma condição na qual a criança enfrenta limitação importante na relação com um adulto responsável por sua criação. Um exemplo clássico é criação em orfanato ou em lares adotivos, que muitas vezes acontece porque as crianças foram negligenciadas por seus pais biológicos (Levine, 2005). Os trabalhos seminais de John Bowlby sobre a importância das relações familiares na saúde mental de crianças (Duniec and Raz, 2011) e de Miron Hofer a respeito da regulação maternal na fisiologia de seus filhotes (Hofer, 1987; Hofer, 1994) pavimentou uma área do conhecimento extremamente prolífica.

De acordo com os estudos epidemiológicos essas circunstâncias adversas durante a infância representam fatores de risco robustos para o desencadeamento de depressão, ansiedade, TEPT, esquizofrenia (Agid et al., 1999; Gibb et al., 2007; Gutman and Nemeroff, 2003; Penza et al., 2003; Springer et al., 2007). Entretanto, esses estudos têm caráter retrospectivo e dependem, em grande parte, da evocação dos eventos por parte dos participantes. Embora o emprego de modelos animais de adversidade na infância seja essencial para estabelecer relações de causa e consequência e desvendar os mecanismos geradores, estes têm fornecido resultados discrepantes que dificultam as conclusões e elaborações de hipóteses de trabalho. Parte dessas discrepâncias deve-se à diversidade de modelos, de seu emprego em diferentes fases do desenvolvimento neonatal e por períodos de tempo diferentes (Lehmann and Feldon, 2000) e, acredito também, que o uso de diferentes linhagens também possa representar uma fonte adicional de controvérsia.

Um elegante modelo de negligência vem gerando achados neurobiológicos importantes a respeito do impacto da adversidade durante a infância. Este modelo é baseado na oferta limitada de material para a construção do ninho, entre os DPN 2 e 9, e os resultados observados em ratos e camundongos são muito semelhantes. Devido à escassez de material para construir o ninho, o comportamento maternal fica prejudicado, com menor frequência de limpeza ano-genital e amamentação e maior frequência de saída das mães dos ninhos. Além da fragmentação do comportamento maternal ser uma fonte de estresse para o filhote, essa condição também produz estresse para a mãe, demonstrado por aumento das concentrações de CORT e aumento do peso relativo das glândulas adrenais (Ivy et al., 2008; Rice et al., 2008). Para as proles, os efeitos imediatos dessa condição incluem aumento das concentrações plasmáticas de CORT e dos pesos absoluto e relativo das glândulas adrenais, redução de CRHR1 na hipófise (mecanismo

compensatório pelo aumento de liberação de CRH) e redução de GR no NPV e córtex frontal (Avishai-Eliner et al., 2001). Os efeitos tardios dessa manipulação em camundongos envolvem aumento dos índices clássicos de ativação do eixo HPA (Rice et al., 2008), enquanto que em ratos, observa-se prejuízo do desempenho em tarefas dependentes do HPC, provavelmente decorrente do aumento de interneurônios CRH em CA₁ e CA₃ do HPC (Ivy et al., 2010). Essa mediação é confirmada pela reversão dos efeitos após tratamento dos animais submetidos ao estresse neonatal com antagonista de CRH e pela observação *in vitro* de que o CRH inibe a potenciação de longo-prazo (LTP, acrônimo para *long-term potentiation*) hipocampal e produz atrofia dos neurônios piramidais em CA₁ com redução das espinhas dendríticas nesses neurônios (Ivy et al., 2010; McClelland et al., 2011).

Porém, no contexto desta tese, o enfoque será dado aos estudos que empregam dois modelos de ruptura da relação mãe-filhote e que são empregados em nossos estudos: a separação materna e a privação materna. A separação materna (SM) refere-se ao caso de remoções repetidas das ninhadas para longe de suas mães por períodos de 3 a 8 h por dia, enquanto que a privação materna (PM) refere-se a uma única remoção por um período de 24 h.

4.2.1 Separação materna

A SM vem sendo usada como modelo animal de vulnerabilidade para transtornos de ansiedade e depressão, porque os animais apresentam algumas características semelhantes às de pacientes que sofrem desses transtornos. Geralmente a SM consiste em separar os filhotes de suas mães diariamente, por 3 h, do DPN 2 ao DPN 14; os resultados são comparados aos de grupos submetidos à separação materna breve (SMB) ou *early handling* que consiste em manter as ninhadas longe de suas mães por 15 min, diariamente, no mesmo período da vida. Outro grupo de comparação consiste de filhotes controle não manipulados ou submetidos à rotina de biotério. Entre as principais alterações relatadas, pode-se citar aumento da resposta de ACTH e CORT a vários estressores, sem modificação das concentrações basais (Huot et al., 2001; Kalinichev et al., 2002; Ladd et al., 2004; Ladd et al., 2005; Plotsky and Meaney, 1993), aumento da expressão do RNAm e maior conteúdo de CRH no NPV (Plotsky e Meaney, 1993) no CeA, BNST e LC e aumento da densidade de CRHR1 no LC (Plotsky et al., 2005). Animais submetidos à SM também apresentam aumento das concentrações de NA no NPV e redução da densidade dos

receptores noradrenérgicos pré-sinápticos, $\alpha 2$ (Liu et al., 2000) e redução da densidade de receptores GABA_A no LC e NTS (Caldji et al., 2000), que confirma aumento da atividade dos dois sistemas mais envolvidos com a resposta de estresse. Do ponto de vista comportamental, a SM aumenta as reações de medo, tanto no LCE (menos exploração dos braços abertos, Kalinichev et al., 2002), no teste de supressão do consumo alimentar induzido por novidade e maior resposta de sobressalto (Caldji et al., 1998; Kalinichev et al., 2002). Além dessas alterações, animais adultos, submetidos à SM apresentam aumento de preferência por álcool, que é revertido pelo tratamento crônico com citalopram, um inibidor seletivo de recaptção de serotonina (ISRS), replicando a co-morbidade existente entre transtornos ansiosos e consumo de drogas (Huot et al., 2001).

Na busca por um modelo de vulnerabilidade para insônia induzida por estresse, característica de indivíduos ansiosos (Larsson et al., 2008; Morin et al., 2003; Waters et al., 1993) e devido a evidências de que estresse durante a infância predispõe seres humanos a apresentarem problemas de sono quando adultos (Greenfield et al., 2011), nós utilizamos a SM e, na idade adulta, machos e fêmeas foram submetidos a um estressor físico (1 h de estresse de frio à 4°C). Este grupo foi comparado aos grupos CTL, não manipulado, e SMB. Contrário à nossa previsão, os machos SM apresentaram resposta de CORT ao estressor semelhante aos outros dois grupos, porém, mais surpreendente foi o fato deste grupo despendar mais tempo em SREM durante a fase clara do ritmo diurno (correspondente ao período de descanso do animal), tanto antes quanto após o estressor, e apresentar rebote de SOL na fase escura de mesma magnitude do que os outros grupos. Esses resultados significam que a SM não prejudica o sono basal ou pós-estresse em ratos machos (Tiba et al., 2004). Estes resultados intrigantes nos motivaram a avaliar um aspecto do comportamento maternal: resgate dos filhotes no momento da reunião com suas mães. Essa avaliação foi realizada diariamente e revelou que as mães resgatam suas ninhadas mais rapidamente quando ficam separadas por mais tempo (SM) do que aquelas do grupo SMB. Em fêmeas, os resultados foram muito parecidos aos relatados acima, exceto pelo fato de que só houve aumento do tempo despendido em SOL e SREM em resposta ao estressor. Em relação às concentrações de CORT, ambos SMB e SM liberaram menos hormônio em resposta ao estressor do que o grupo CTL (Tiba et al., 2008b).

Muitas das consequências prejudiciais da SM têm sido atribuídas à piora na qualidade do comportamento maternal ao reunir a ninhada com sua mãe, com base no fato de que filhotes separados por muito tempo não emitem vocalizações ultrassônicas,

que estimulam os cuidados maternos (Bell et al., 1974). Entretanto, estudos demonstram que filhotes mantidos longe dos ninhos por 3 a 6 h não emitem vocalizações, mas estimulam aumento dos cuidados em suas mães (Zimmerberg et al., 2003). As mães parecem responder proporcionalmente às demandas de seus filhotes, de modo que aqueles mantidos longe por 12 h e, portanto, em grande necessidade de cuidados ao retornar para o ninho, recebem muita atenção (Pereira and Ferreira, 2006). Portanto, concluímos que os efeitos benéficos sobre o sono em decorrência da SM poderia ser explicado pelo aumento de pelo menos um aspecto do comportamento maternal.

Em vista da estreita relação existente entre GCs, HPC e AMI, nós realizamos um estudo para examinar se a SM teria impacto sobre a memória de medo ao contexto (tarefa dependente do HPC) e no condicionamento de medo ao som (tarefa independente do HPC). Na tarefa de condicionamento de medo ao contexto (CMC), os animais são expostos por 2 min a um compartimento escuro, contendo algumas pistas visuais. Depois desse período, uma série de 5 choques de 0,6 mA de intensidade, duração de 1 s, espaçados entre si por 29 s, foi aplicada aos animais e no dia seguinte (24 h), os animais foram expostos ao mesmo compartimento, porém, sem apresentação dos choques e permaneceram por 5 min, durante os quais o tempo de comportamento de congelamento (expressão de medo) foi registrado. Infere-se que quanto maior o tempo de congelamento, melhor é a evocação do estímulo aversivo e, portanto, melhor é o desempenho do animal nessa tarefa. Para a tarefa de condicionamento de medo ao som (CMS), o animal é exposto ao compartimento escuro e a mesma série de choques é aplicada, porém, desta vez, o pareamento de cada choque é feito com um som de duração de 5 s. No último segundo, o choque é aplicado, de modo que no dia seguinte o animal é testado em outro ambiente, completamente diferente do primeiro e, neste caso, são apresentados 5 tons com as mesmas características das do dia anterior e avalia-se o tempo de comportamento de congelamento. Após cada treino foram realizadas curvas tempo-resposta de ACTH e CORT para avaliação do impacto do evento aversivo (choque nas patas). Novamente não observamos alterações decorrentes da SM na resposta hormonal de estresse, nem no tempo despendido em congelamento no CMC e no CMS (Guijarro et al., 2007). Com esses resultados, nós especulamos que as linhagens das mães poderiam ser o fator determinante para a ausência de efeitos em nossos experimentos. Enquanto que os estudos mencionados acima foram realizados com a linhagem Long-Evans, nossos experimentos foram realizados com a linhagem Wistar, e outros estudos que utilizaram essa linhagem mostram redução de comportamento do

tipo-ansioso (Hulshof et al., 2011; Ploj et al., 2002; Roman et al., 2006a). Mesmo estendendo o período de SM para 6 h diárias, nós não tivemos sucesso em produzir alterações comportamentais relacionadas à ansiedade e depressão em machos e fêmeas na adolescência ou na idade adulta. Esse achado pode ser decorrente do fato de que as mães parecem ser resistentes à separação de seus filhotes, uma vez que apresentaram menos comportamento de imobilidade no TNF, sugerindo que esta linhagem possa ser menos vulnerável a esse tipo de manipulação (Dissertação de Mestrado de Janaína da Silva Rocha).

A existência de alta co-morbidade entre depressão, ansiedade e abuso de drogas também foi testada no modelo da SM em diversos paradigmas de vulnerabilidade para dependência de drogas, como a sensibilização comportamental induzida por psicoestimulantes, preferência por álcool, auto-administração e condicionamento de preferência por lugar. Embora em geral os estudos revelem aumento de vulnerabilidade ao abuso, algumas sutilezas nos protocolos experimentais podem gerar dados conflitantes. Além disso, parece haver uma clara influência do sexo nessa vulnerabilidade, sendo que machos tendem a ser mais afetados pela SM do que fêmeas. Por exemplo, em comparação com animais CTL não-manipulados, ratos SM aprendem a auto-administrar cocaína com doses mais baixas (Moffett et al., 2007), exibem preferência por morfina no condicionamento de preferência a lugar (Vazquez et al., 2005) e consomem mais álcool (Huot et al., 2001; Ploj et al., 2003; Roman and Nylander, 2005). Camundongos machos submetidos à SM também apresentam aumento pela preferência por concentração maior de álcool, avaliada no paradigma de escolha entre garrafas que contém solução de sacarina, solução de álcool a 6% ou a 10% (Cruz et al., 2008), em concordância com um estudo anterior em que ratos machos SM preferem concentrações mais altas de álcool do que os CTL, sem diferença entre os grupos no consumo de solução de baixa concentração (Ploj et al., 2003). Existem, no entanto, diferenças sexuais nesse padrão de comportamento, uma vez que ratas SM não diferem de fêmeas CTL (Gustafsson et al., 2007; Roman et al., 2004), mesmo em linhagens obtidas pelo cruzamento seletivo para gerar animais com preferência espontânea pela droga (Roman et al., 2005a; Roman and Nylander, 2005).

Os estudos com sensibilização comportamental, um paradigma útil para estudar a neurobiologia da exposição repetida a drogas de abuso, também mostram o impacto da SM. A administração repetida de uma droga de abuso produz alterações persistentes no

funcionamento do circuito de recompensa cerebral contribuindo, assim, para o processo de dependência por aumentar as propriedades motivacionais da droga (Piazza et al., 1989) e promover a sua procura e o seu uso compulsivo (Robinson and Berridge, 1993). Esta adaptação neural também é acompanhada por mudança comportamental, caracterizada por aumento de atividade locomotora, fenômeno conhecido como sensibilização comportamental ou “tolerância reversa” (Robinson and Berridge, 1993; Robinson and Berridge, 2000). Os estudos revelam que a SM produz efeitos dependentes do sexo, uma vez que machos, mas não fêmeas, apresentam maior locomoção induzida por anfetamina (Pryce et al., 2001) e mais sensibilização comportamental induzida por morfina, do que ratos CTL (Kalinichev et al., 2003). Em um estudo de nosso grupo, camundongos fêmeas SM apresentaram desenvolvimento mais rápido da sensibilização comportamental ao álcool do que os machos, porém, ao final do período de indução, ambos os sexos exibiram alteração semelhante do comportamento (Kawakami et al., 2007). Porém, existem relatos sobre ausência de efeitos induzidos pela SM sobre a sensibilização comportamental induzida por cocaína (Marin and Planeta, 2004) ou anfetamina (Weiss et al., 2001). Mais uma vez essas diferenças podem ser atribuídas ao uso de diferentes grupos CTL, de linhagens de animais, de espécies e de protocolos experimentais. De fato, o protocolo experimental para indução de sensibilização comportamental parece ser um aspecto fundamental, pois recentemente publicamos um estudo em que a diferença sexual e a influência da SM anteriormente observadas no desenvolvimento de sensibilização comportamental ao álcool não foram confirmadas, utilizando um protocolo ligeiramente diferente. Apesar disso, observamos uma importante interação entre SM e sexo em outros aspectos avaliados nesse trabalho. Apenas os machos SM não apresentaram habituação ao tratamento repetido com álcool e esses animais também exibiram alterações neuroquímicas compatíveis com a neurobiologia da ansiedade, tais como aumento das concentrações hipocâmpais de NA, DA e 5-HT, enquanto que as fêmeas SM tratadas cronicamente com álcool exibiram aumento de DA e 5-HT no CPF, alterações compatíveis com a perda de controle observada na dependência de drogas. Esses resultados revelam a complexidade existente na interação entre sexo, estresse neonatal e exposição crônica ao álcool que pode produzir alterações neuroendócrinas e neuroquímicas que caracterizam o aumento de vulnerabilidade a diversos aspectos da dependência de drogas e transtornos psiquiátricos dependentes do sexo (Kawakami et al., 2013).

O último aspecto a ser abordado neste item diz respeito aos efeitos da SM na atividade do sistema imunológico em um modelo de doença auto-imune, o *lupus* eritematoso e um modelo de câncer, melanoma, ambos desenvolvidos em camundongos. O racional para investigarmos essa relação reside no fato de que os GCs são potentes moduladores do sistema imunológico e o estresse parece ser um desencadeador importante dessas doenças (Sapolsky et al., 2000). Entretanto, a influência da SM no desencadeamento de doenças auto-imunes tem-se mostrado controversa, uma vez que relata-se que a SM reduz (Laban et al., 1995) ou aumenta (Stephan et al., 2002) a susceptibilidade em modelo de esclerose múltipla, enquanto que em um modelo de artrite reumatoide induzida por adjuvante de Freund, a SM não tem qualquer efeito (Lariviere et al., 2006). No modelo espontâneo de *lupus* eritematoso nós também não conseguimos estabelecer uma relação entre o estressor neonatal e o desencadeamento e progressão da doença. Curiosamente, em animais CTL, observamos uma clara relação entre as concentrações de CORT e a progressão da doença, relação esta que foi totalmente perdida nos animais SM (Catallani et al., 2008).

Em relação ao impacto do estresse neonatal na vulnerabilidade ao câncer, existem apenas dois trabalhos sobre o desenvolvimento de câncer de mama. Em um deles, fêmeas de camundongos, submetidas à SM, tiveram maior incidência e desenvolvimento mais rápido de tumor do que aquelas submetidas à SMB e o mecanismo proposto para esse efeito foi o aumento da densidade de receptores para estrógeno do tipo alfa (Boyd et al., 2010). O segundo estudo, feito em ratas, averiguou a interação entre a SM e a REST crônica (10 h por dia, por 6 dias) na idade adulta sobre a colonização do tumor, 3 semanas após a inoculação. Tanto no grupo SM quanto no grupo CTL, o estressor produziu aumento das concentrações de CORT (imediatamente ao final do período de REST). Porém, apenas as ratas SM apresentaram redução da citotoxicidade das células *natural killer* (NK), responsáveis pelo combate ao tumor, indicando que o estresse neonatal aumenta a susceptibilidade do sistema imunológico aos efeitos do estresse na idade adulta (Nakamura et al., 2011).

No estudo conduzido em nosso grupo (trabalho de Pós-Doutorado de Beatriz Helena Pizarro De Lorenzo, dados não publicados), camundongos C57BL/6 foram submetidos à SM, por 3 h ao dia, entre os DPN 2 e 14. Quando adultos, os machos de cada ninhada foram distribuídos em três grupos: não-estressado (basal), REST aguda (2 h no DPN 59), ou crônica (2 h/dia, por 7 dias, começando no DPN 53). No DPN 60, todos os animais foram

inoculados com uma suspensão contendo as células do tumor melanoma murino, B16F10, pela veia da cauda. Essa forma de inoculação produz migração das células para o pulmão, onde ocorre colonização e metástase. Quinze dias após a inoculação, os animais foram eutanaziados e baço, pulmões e soro foram coletados para as análises de colônias metastáticas (Figura 5.1), células T (Figura 5.2), células TCD4, TCD8, NK e T reguladoras (Figura 5.3), interleucinas (IL) 6 e 10 (Figura 5.4) e concentrações de CORT (Figura 5.5).

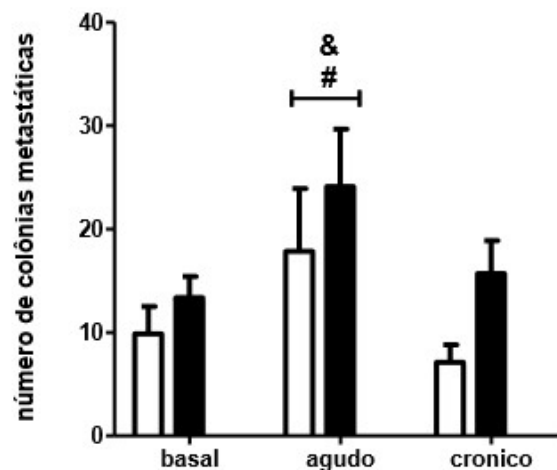


Figura 4.2 – Número de metástases nos pulmões de animais controle (CTL, barras brancas) e submetidos à separação materna (SM, barras pretas), não desafiados (basal) ou expostos à REST aguda ou crônica na idade adulta, antes da inoculação endovenosa de células de melanoma murino B16F10. & - Diferente do respectivo grupo na condição basal; # - Diferente do respectivo grupo na condição crônica ($p < 0.05$). Basal CTL n=10; agudo CTL n=7; crônico CTL n=8; basal SM n= 11; agudo SM n=12; crônico SM n=11.

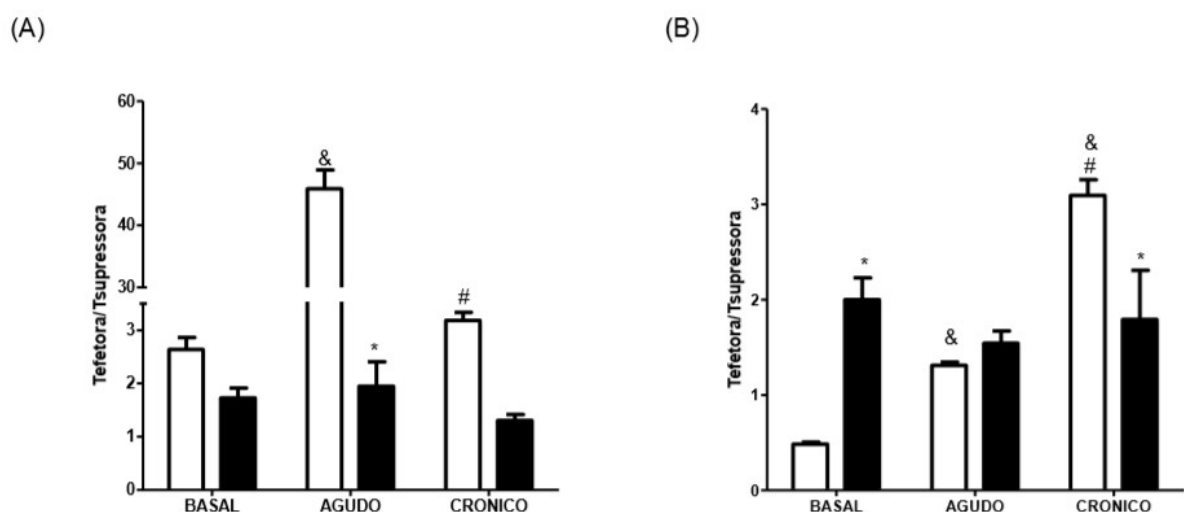


Figura 4.3 – Relação entre células T efetoras e T reguladoras no baço (A) e no pulmão (B) de animais controle (CTL, barras brancas) e submetidos à separação materna (SM, barras pretas), não desafiados (basal) ou expostos à REST aguda ou crônica na idade adulta, antes da inoculação endovenosa de células de

melanoma murino B16F10. * - Diferente do respectivo grupo CTL; & - Diferente do respectivo basal; # - Diferente do respectivo grupo na condição agudo ($p < 0,05$).

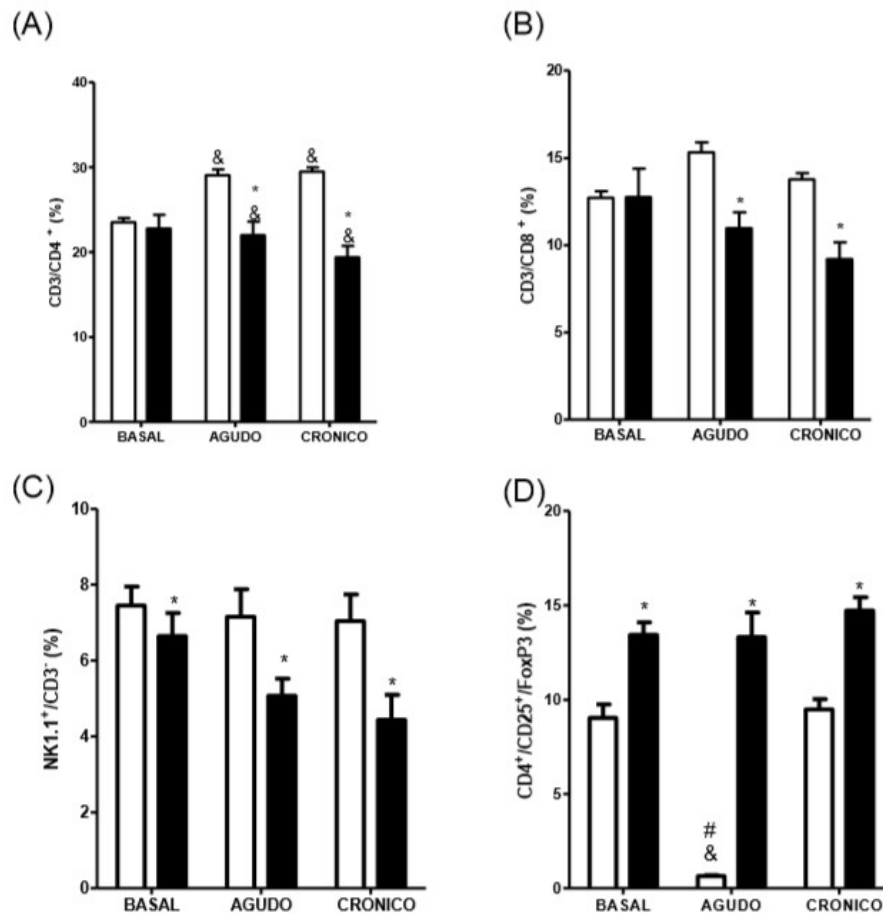


Figura 4.4 – A separação materna reduz a produção de células NK. Células esplênicas de animais controle (CTL, barras brancas) e submetidos à separação materna (SM, barras pretas), não desafiados (basal) ou expostos à REST aguda ou crônica na idade adulta, antes da inoculação endovenosa de células de melanoma murino B16F10 foram analisadas por citometria de fluxo. As células analisadas foram TCD4 (A), TCD8 (B), NK (C) e Treg (D). * - Diferente do respectivo grupo CTL; & - Diferente do respectivo basal; # - Diferente do respectivo grupo na condição agudo ($p < 0,05$).

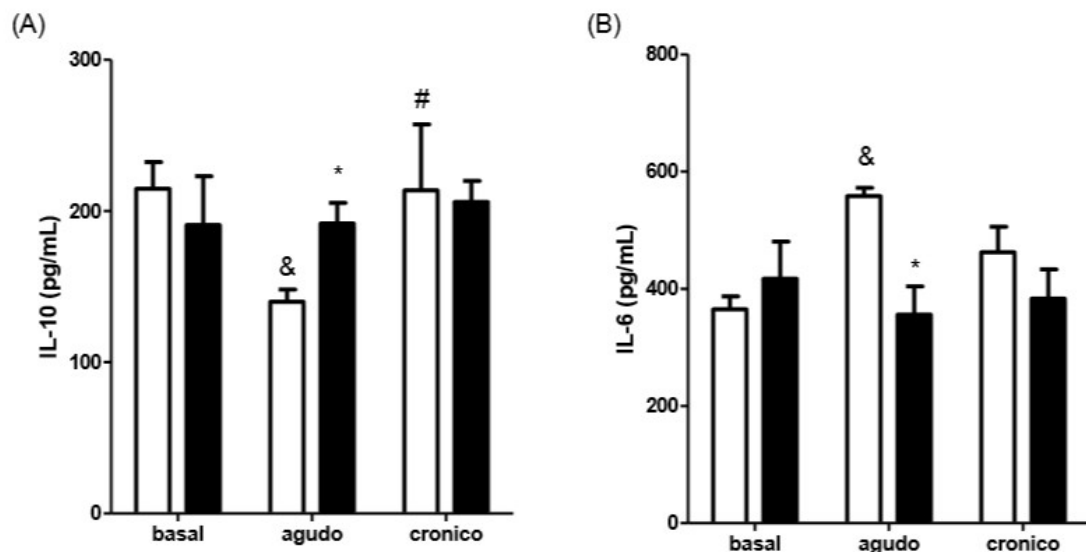


Figura 4.5 – Separação materna inverte o perfil de produção de citocinas séricas. O soro de animais controle (CTL, barras brancas) e submetidos à separação materna (SM, barras pretas), não desafiados

(basal) ou expostos à REST aguda ou crônica na idade adulta, antes da inoculação endovenosa de células de melanoma murino B16F10 foi analisado por ELISA, quanto à produção de citocinas IL-10 (A) e IL-6 (B). * - Diferente do respectivo grupo CTL; & - Diferente do respectivo grupo na condição basal; # - Diferente do respectivo grupo na condição agudo ($p < 0,05$).

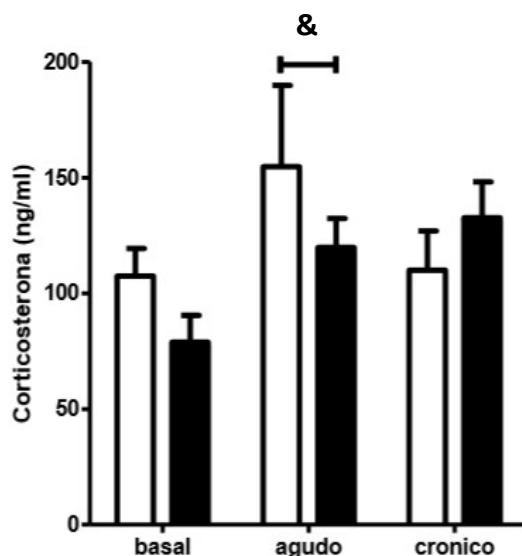


Figura 4.6 – O soro de animais controle (CTL, barras brancas) e submetidos à separação materna (SM, barras pretas), não desafiados (basal) ou expostos à REST aguda ou crônica na idade adulta, antes da inoculação endovenosa de células de melanoma murino B16F10, foi analisado por radioimunoensaio para determinação das concentrações de CORT. & - Diferente do respectivo grupo na condição basal.

Os resultados desse estudo (manuscrito em preparação) sugerem que o estressor aplicado agudamente produz padrões distintos de resposta imunológica nos animais CTL e MS, sendo que nos primeiros, o perfil é pró-inflamatório e no segundo, imunossupressor. Por outro lado, o estressor aplicado cronicamente favoreceu o desenvolvimento de metástases em animais MS e este efeito pode ter sido mediado por uma supressão sobre a atividade de células NK, provavelmente devida à persistência da secreção de CORT que não demonstrou indício de retorno às concentrações basais, como ocorreu com os animais do grupo CTL.

4.2. Efeitos da privação materna sobre a resposta de estresse e comportamentos emocionais

4.2.1. Efeitos imediatos

Os estudos sobre PM foram, inicialmente, conduzidos para testar a hipótese de que a resposta consumatória em filhotes de ratos seria capaz de inibir a atividade adrenocortical como havia sido demonstrado em animais adultos. Para esse fim, filhotes com 12, 16 ou 20 dias de vida foram separados de suas mães para aumentar a motivação para consumir o leite em um ambiente novo. Para surpresa dos autores, esse

procedimento produziu um aumento robusto (e inesperado, devido ao PHRE) das concentrações de CORT nos filhotes com 12 dias de vida e que não foram suprimidos pela infusão de leite, mas apenas pela presença de uma mãe anestesiada (Stanton et al., 1987). Esses resultados sugeriam que, à semelhança de outros processos fisiológicos, como frequência cardíaca (Hofer, 1984) e liberação de hormônio de crescimento (Kuhn et al., 1978), a presença materna também regulava a resposta adrenal de estresse, porém de maneira inibitória. Esse estudo foi o ponto de partida para uma série de trabalhos realizados para caracterizar e entender a ontogênese da resposta de estresse e o impacto da ruptura da relação mãe-filhote nessa resposta.

Um dos primeiros estudos sobre a caracterização dos efeitos do afastamento dos filhotes de suas mães investigou a duração necessária para gerar o aumento das concentrações de CORT em filhotes nos DPN 3 (fora do PHRE), 7 ou 11. As ninhadas foram afastadas por 0 h (ou seja, permaneceram com suas mães o tempo todo), 2 h, 4 h, 8 h ou 24 h. Ao final de cada período, as concentrações de CORT, basais, induzidas por estresse ou por administração de ACTH, foram determinadas e observou-se que aos 7 e 11 dias eram necessárias 8 h de afastamento para gerar aumento das concentrações basais. Em resposta aos estímulos, os animais no DPN 3 exibiram elevação das concentrações, mesmo estando na presença da mãe, enquanto que nas outras idades o afastamento por 24 h produziu respostas robustas de CORT (Levine et al., 1991). Portanto, para que ocorra desinibição da resposta adrenocortical ao estresse são necessárias, pelo menos, 8 h de separação da mãe. Porém essa resposta não é cumulativa ao longo de, pelo menos três separações, como ficou comprovado posteriormente, ou seja, cada vez que o filhote é reunido com sua mãe, a atividade adrenocortical é inibida outra vez (Rosenfeld et al., 1992).

Quanto aos efeitos da PM sobre a hipófise, os achados mostram que não há aumento das concentrações basais de ACTH em filhotes submetidos à PM nos DPN 5 (e testados aos 6 dias de vida, PM6), 8 (e testados aos 9 dias de vida, PM9) ou 11 (e testados aos 12 dias de vida, PM12). Entretanto, em resposta à administração de salina isotônica, os filhotes do grupo CTL apresentam aumento dos valores de ACTH, à semelhança dos filhotes PM6 e PM9. Somente os filhotes PM12 apresentaram resposta de ACTH mais robusta ao estressor do que seu respectivo grupo CTL. Como apresentado no Capítulo 3, o pico de resposta de ACTH a estressores em animais adultos ocorre em torno de 5 a 10 min. Porém, observamos que nos filhotes PM9 o pico ocorreu 20 min após o estressor e que para os

filhotes PM12, o aumento ocorreu aos 5 min e perdurou até os 20 min, sem indicação de retorno aos valores basais (Suchecki et al., 1993a). Na realidade, a resposta de ACTH de filhotes PM9, PM12 e PM15 (fora do PHRE) ao estresse perdura até 120 min após a aplicação do estímulo e, ao contrário do que se observa em animais adultos, a aplicação de um estímulo (vapores de éter ou injeção de salina isotônica) não inibe a resposta a uma segunda aplicação do estressor 1 h após a primeira, o que demonstra que a imaturidade do sistema de *feedback* negativo não é modificada pela privação materna (Suchecki et al., 1995).

4.2.2. Efeitos a médio-prazo

Os efeitos da PM em animais adolescentes dependem da idade em que a privação ocorreu. Em relação ao eixo HPA, animais previamente submetidos à PM no DPN 11 apresentam redução da secreção de ACTH aos 20 dias de vida (Smith et al., 1997; van Oers et al., 1997) e de CORT aos 30 dias de vida (Suchecki and Tufik, 1997). Além disso, a ativação do NPV é menor em filhotes PM11, quando avaliados aos 20 dias de vida. Esses resultados sugerem que a PM aos 11 dias de vida gera hipo-responsividade na adolescência precoce. Porém, quando a PM é imposta no DPN 3, os adolescentes aos 20 dias de vida apresentam aumento da resposta de ACTH à salina isotônica e esses animais também apresentam maior ativação neuronal no NPV (van Oers et al., 1998a), sugerindo que são hiper-responsivos ao estresse.

Recentemente, demonstrou-se que PM no DPN 3 afeta neurogênese hipocampal em animais pré-puberes (DPN 21), produzindo redução de neurônios imaturos em fêmeas e aumento em machos submetidos à essa manipulação. De forma geral, tanto a proliferação quanto a sobrevivência neuronal foram menores em fêmeas do que em machos, enquanto que o número de astrócitos apresentou perfil inverso. Em relação ao comportamento maternal, os machos receberam mais cuidados do que fêmeas; porém, todos os filhotes submetidos à PM receberam mais cuidados do que os filhotes do grupo CTL (Oomen et al., 2009). O efeito da PM sobre o destino neuronal é particularmente relevante quando analisamos o fato de que os transtornos afetivos são mais prevalentes em mulheres do que em homens (Bland, 1997) e que adversidade na infância precipita esses transtornos na idade adulta, quando associada à redução do volume do HPC esquerdo (Vythilingam et al., 2002).

Os poucos estudos que relatam os efeitos da privação materna na adolescência indicam, fortemente, que suas consequências são dependentes da fase do desenvolvimento em que é imposta. Animais PM9, testados no DPN 30 não apresentam alterações compatíveis com esquizofrenia (Choy and van den Buuse, 2008), como observado em animais adultos, mas sim aumento de imobilidade no TNF (machos e fêmeas), indicando perfil depressivo, apesar de redução das concentrações basais de CORT (Llorente et al., 2007; Marco et al., 2009). Portanto, algumas alterações comportamentais parecem se manifestar mais precocemente e outras, mais tardiamente. Nosso grupo mostrou que adolescentes, machos e fêmeas, submetidos à PM aos 11 dias de vida (grupo PM11) e testados aos 30 dias de vida são menos ansiosos no teste do campo-aberto, pois ambulam mais na parte central do aparato e realizam menos comportamento de auto-limpeza. Além disso, as concentrações de ACTH em fêmeas PM11 são maiores do que das fêmeas CTL apenas aos 5 min, mas não mais aos 20 min, quando os valores, apesar de menores, ainda acima do basal. As concentrações de CORT, por sua vez, são menores em fêmeas PM11 do que em CTL aos 5 min após o teste de ansiedade e ambos os grupos apresentam concentrações semelhantes aos 20 min pós-campo aberto. A relação entre as concentrações de CORT e ACTH aos 20 min sugerem que fêmeas PM11 apresentam *feedback* negativo mais eficiente (Suchecki et al., 2000b), embora o RNAm para GR seja menor no NPV e no HPC de animais PM11 testados aos 20 dias (van Oers et al., 1997). Ainda assim, podemos especular que outros sítios envolvidos com o *feedback* negativo possam apresentar maior densidade de GR ou que, devido ao intenso dinamismo que marca essa fase da vida, os resultados obtidos no DPN 20 sejam diferentes daqueles obtidos no DPN 30.

Em um estudo recentemente finalizado, nosso grupo avaliou o desenvolvimento físico (peso corporal, consumo alimentar e crescimento) de ratos, machos e fêmeas, porque diversos estudos relatam menor ganho de peso corporal nesses animais. As ninhadas foram submetidas à PM nos DPN 3 ou 11 (grupos PM3 e PM11) e os filhotes foram acompanhados desde o DPN 23 até a adolescência tardia (DPN 51). No DPN 52, esses animais foram expostos ao LCE e após a avaliação do comportamento do tipo-ansioso, foram perfundidos para a fixação dos encéfalos para posterior avaliação da imunorreatividade do neuropeptídeo Y (NPY) em estruturas relacionadas com o comportamento alimentar (núcleo arqueado do hipotálamo [NArq]) e com comportamento do tipo-ansioso (AMI). A escolha desse possível mediador deveu-se ao

fato de que o NPY foi, inicialmente, identificado no NArq, e sua função está relacionada à indução do comportamento alimentar; posteriormente detectou-se seu efeito ansiolítico em diversos testes utilizados para essa finalidade. A maior concentração de neurônios produtores de NPY encontra-se no NArq e projetam-se para a SCP, HPC, septo lateral ventral, NAcc e AMI; além disso, projeções importantes partem da AMI e HPC para LC, SCP e septo lateral dorsal (Heilig, 2004). Como havíamos previsto os filhotes PM3 e PM11 eram mais leves (Figura 4.6) e menores (comprimento corporal determinado pela distância do focinho à base da cauda) do que o grupo CTL (Figura 4.7). Este fato deveu-se, pelo menos em parte, ao menor consumo alimentar desses animais no período noturno (Figura 4.8). No LCE apenas os adolescentes PM3 exibiram aumento do comportamento do tipo-ansioso, ao entrarem e permanecerem menos tempo nos braços abertos, enquanto que os animais PM11 não diferiram dos adolescentes CTL (Figura 4.9). Finalmente, a densitometria óptica dos neurônios imunorreativos para NPY (NPY-ir), foi menor em ambos os grupos submetidos à PM, em acordo com o padrão alimentar dos animais (4.10A). A avaliação de NPY-ir na BLA revelou que tanto os machos quanto as fêmeas de ambos os grupos submetidos à PM, expressaram menos NPY do que seus respectivos grupos CTL, sendo que os machos expressaram mais NPY do que fêmeas (Figura 4.10B). Estes resultados sugerem que o NPY produzido na AMI pode ser um dos mediadores do comportamento do tipo-ansioso manifestado pelos animais PM3; entretanto, não é possível explicar, no momento, quais seriam as implicações da redução deste neuropeptídeo para o grupo PM11.

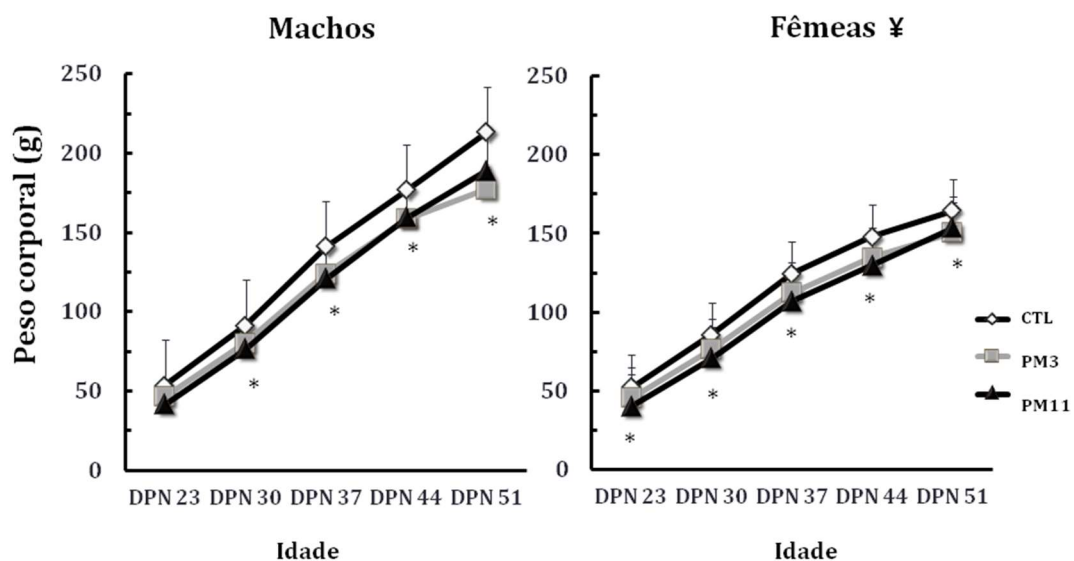


Figura 4.7 – Evolução ponderal de adolescentes, machos e fêmeas, submetidos à PM nos DPN 3 (PM3) ou 11 (PM11) em comparação com animais controle (CTL). * - Ambos os grupos PM3 e PM11 foram diferentes dos respectivos grupos CTL; ¥ - Todas as fêmeas diferem dos respectivos machos. DPN: Dia pós-natal. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão de 18-24 animais/sexo/grupo.

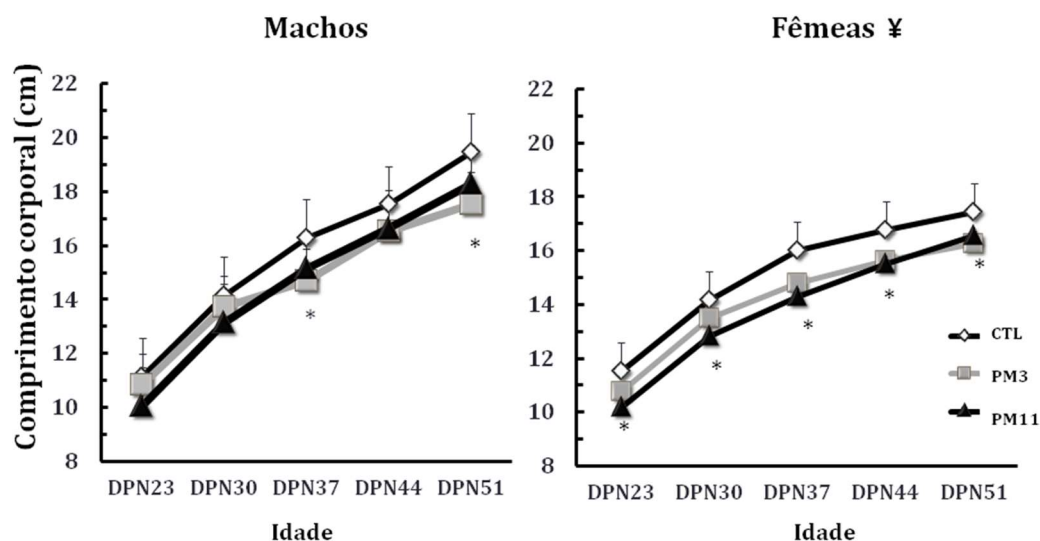


Figura 4.8 – Crescimento de adolescentes, machos e fêmeas, submetidos à PM nos DPN 3 (PM3) ou 11 (PM11) em comparação com animais controle (CTL). * - Ambos os grupos PM3 e PM11 foram diferentes dos respectivos grupos CTL nos dias indicados; ¥ - Todas as fêmeas diferem dos respectivos machos. DPN: Dia pós-natal. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão de 18-24 animais/sexo/grupo.

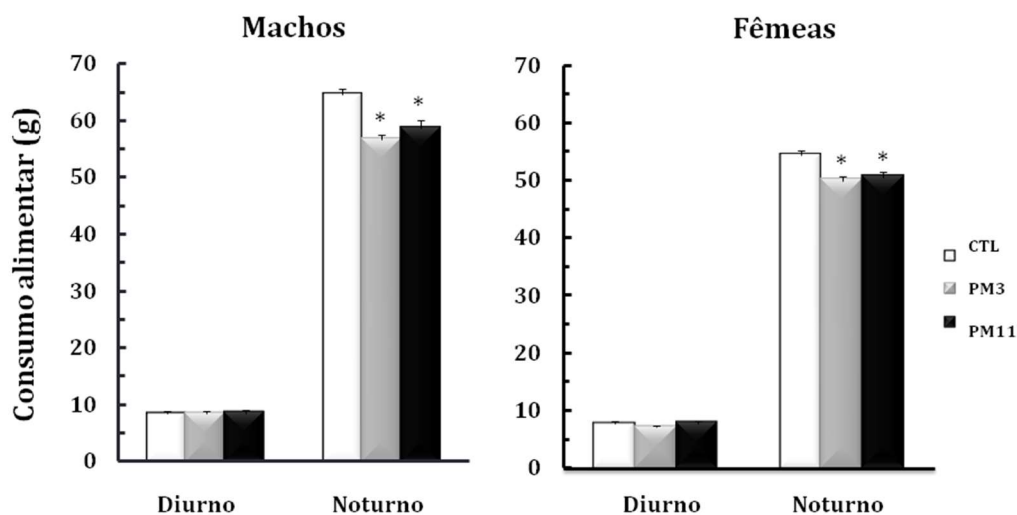


Figura 4.9 – Consumo alimentar, acumulado ao longo de cinco semanas de avaliação, de adolescentes, machos e fêmeas, submetidos à PM nos DPN 3 (PM3) ou 11 (PM11) em comparação com animais controle (CTL). * - Diferente do respectivo grupo CTL. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão de 18-24 animais/sexo/grupo.

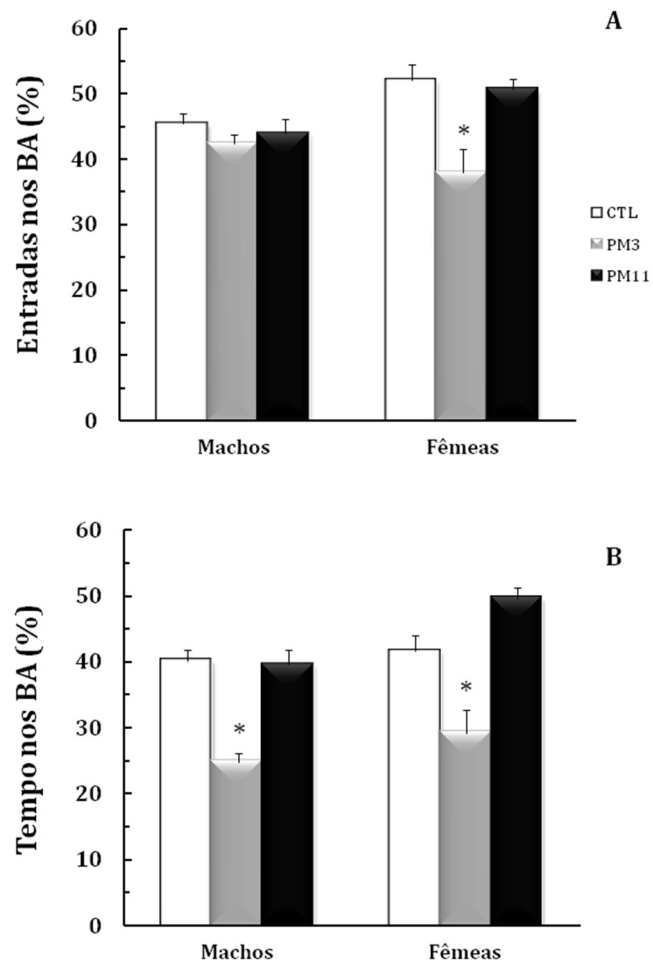


Figura 4.10 – Comportamento do tipo-ansioso, medido no labirinto em cruz elevado, de adolescentes, machos e fêmeas, submetidos à PM nos DPN 3 (PM3) ou 11 (PM11) em comparação com animais controle (CTL). (A) Porcentagem de entradas nos braços abertos; (B) Porcentagem de tempo despendido nos braços abertos. * - Diferente do respectivo grupo CTL. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão de 18-24 animais/sexo/grupo. BA: Braços abertos.

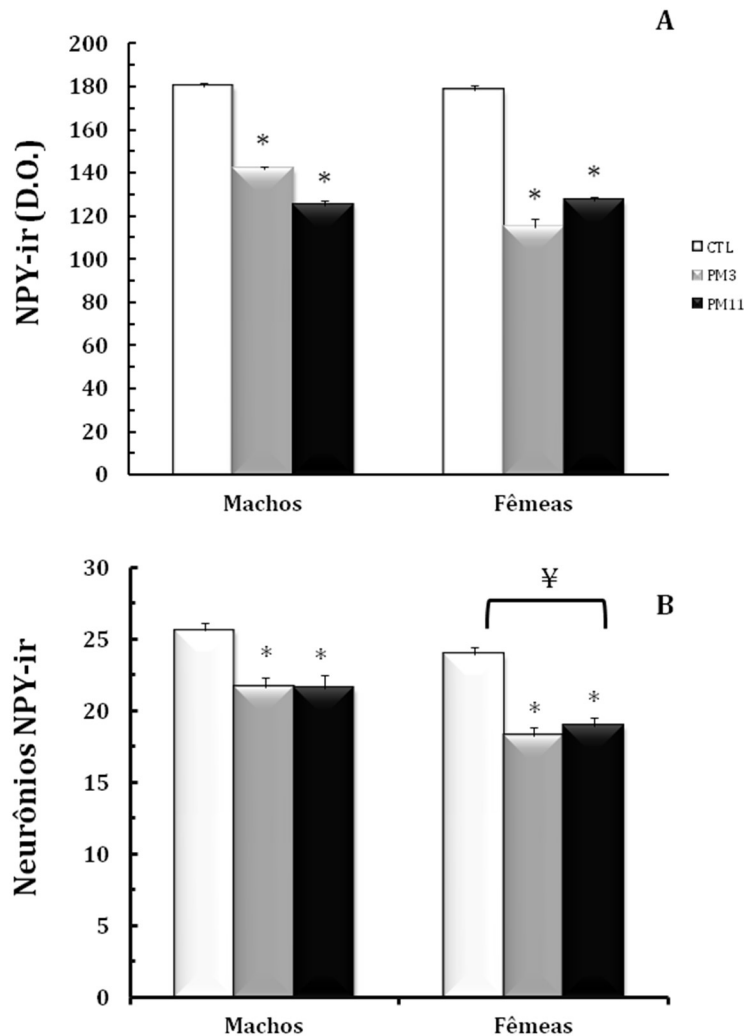


Figura 4.11 – Avaliação da imunorreatividade para NPY no núcleo arqueado do hipotálamo (A) e na amígdala basolateral (B) de adolescentes machos e fêmeas submetidos à PM nos DPN 3 (PM3) ou 11 (PM11) em comparação com animais controle (CTL). * - Diferente do respectivo grupo CTL. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão de 5-7 animais/sexo/grupo (A) e de 10-15 animais/sexo/grupo (B).

4.2.3. Efeitos tardios

Os primeiros estudos sobre as consequências tardias da PM utilizou esse paradigma em ratos Brown Norway no DPN 3, ou seja, antes do início do PHRE e ao serem comparados a ratos CTL no DPN 60, esses animais exibiram reduzida expressão basal de RNAm para CRH na porção parvocelular do NPV, mas ainda assim, as concentrações basais de ACTH e CORT eram mais altas. A expressão de MR e GR no HPC era equivalente nos animais PM3 e CTL, porém PM3 apresentava menor expressão de GR no NPV e na adeno-hipófise, sugerindo menor eficiência do *feedback* negativo no eixo HPA. Neste estudo o sistema dopaminérgico (DAérgico) também foi avaliado e os resultados mostraram aumento da sensibilidade desse sistema, por meio do aumento do comportamento de

estereotipia induzido por apomorfina, um agonista do receptor DAérgico do tipo D₂. Além disso, esses animais apresentavam aumento do RNAm para tirosina hidroxilase (TH), enzima passo-limitante da síntese de NA e DA, na substância negra, mas não na área tegmentar ventral (Rots et al., 1996). Posteriormente o mesmo grupo utilizou a mesma linhagem de ratos e avaliou os efeitos da PM no DPN 3 sobre a resposta ao estresse de novidade aos 3, 12 e 30 meses de vida. Aos 3 meses, o grupo PM3 exibiu retorno mais rápido aos valores basais de CORT do que os animais CTL, enquanto que aos 12 meses o retorno aos valores basais foi mais lento entre os animais privados da mãe e aos 30 meses de vida os grupos não apresentaram diferenças entre si, exceto aos 180 min pós-estresse, quando os PM3 exibiram valores equivalentes ao basal, mas os CTL, não. Todavia, um perfil de secreção distinto foi observado com REST por 10 min: os animais PM3 apresentaram menores concentrações de ACTH e CORT do que os CTL em vários tempos, inclusive no mais tardio (150 min pós-REST). Comparados com animais jovens, os idosos exibiram menor expressão de MR e GR no hipotálamo e redução de GR no HPC, independente de terem ou não sido submetidos à manipulação neonatal (Workel et al., 2001). Infelizmente os autores não apresentaram qualquer hipótese para conciliar a aparente incongruência entre os resultados hormonais e a expressão dos receptores, que indicam deficiência no sistema de regulação do eixo HPA; a única justificativa apresentada para as menores concentrações de CORT nos idosos refere-se a alguma deficiência na síntese de CORT a partir do colesterol (Workel et al., 2001).

Os efeitos deletérios da PM no DPN 3 sobre a neurogênese hipocampal observada na prole feminina aos 21 dias de vida (Oomen et al., 2009)(apresentado no item 4.2.2) não persistem na idade adulta. De fato, nenhuma alteração hipocampal relevante é mantida e os aspectos funcionais, como LTP, também não são diferentes entre fêmeas PM3 e CTL. Ademais, nenhuma diferença no tempo de congelamento na tarefa de CMC foi observada, embora na tarefa de CMS as fêmeas PM3 tenham apresentado aumento do tempo de congelamento, antes e após a apresentação do estímulo sonoro previamente associado ao choque nas patas. Portanto, essas fêmeas apresentam memória emocional independente do HPC, mais consolidada do que fêmeas CTL, o que pode sugerir que a PM nessa idade altera a morfologia da AMI (Oomen et al., 2010). A verificação dessa sugestão mostra que não parece haver alterações na estrutura neuronal e na arborização dendrítica dos neurônios estelares e piramidais da BLA em machos e fêmeas PM3 (Krugers et al., 2012). Ainda em relação às alterações de memória dependente do HPC (labirinto aquático de

Morris), a PM no DPN 3 não parece ter um grande impacto em ratos Brown Norway jovens ou adultos. Porém, animais idosos, tanto o grupo PM3 quanto o CTL, exibem grande variabilidade no desempenho e podem, assim, ser subdivididos em não prejudicados, medianamente prejudicados e prejudicados. Assim, os autores observaram maior proporção de animais do grupo PM3 nos extremos, enquanto que no grupo CTL, a maior proporção encontrava-se no subgrupo medianamente prejudicado, concluindo que a PM3 amplifica as diferenças individuais, pelo menos, no aspecto avaliado (Oitzl et al., 2000).

Quando aplicada no DPN 9, a PM produz alterações comportamentais compatíveis com esquizofrenia. Entre essas alterações, relata-se aumento de sensibilidade à apomorfina (Ellenbroek and Cools, 1995) e deficiência de inibição pré-pulso igualmente em machos e fêmeas (Ellenbroek et al., 1998; Husum et al., 2002), um fenômeno atencional no qual tons de baixa intensidade são capazes de inibir a resposta de sobressalto induzida por um tom de alta intensidade (pulso). Esta deficiência de inibição do pré-pulso não é observada quando a PM é realizada no DPN 13 (Ellenbroek and Cools, 2002) e é menos evidente quando ocorre no DPN 6 (Ellenbroek et al., 1998), o que sugere fortemente a existência de uma janela temporal específica. Estes efeitos, entretanto são dependentes da linhagem do animal, uma vez que apenas ratos Wistar apresentam tais alterações, representando um bom modelo animal (Ellenbroek and Cools, 2000). Este modelo foi farmacologicamente validado, uma vez que drogas empregadas no tratamento da esquizofrenia, como haloperidol e quetiapina, reverteram o prejuízo de inibição pré-pulso em animais PM9 (Ellenbroek et al., 1998). Entretanto, estes resultados não foram replicados por outro grupo. A principal diferença metodológica entre os estudos de Ellenbroek e colaboradores e o de Lehmann e colaboradores (Lehmann et al., 2000) foi o número de ninhadas utilizadas para avaliar os efeitos da PM. Ellenbroek e colaboradores compuseram os grupos experimentais a partir de duas ninhadas, enquanto que no estudo de Lehmann, foram utilizados apenas um macho e uma fêmea de cada ninhada. Essa diferença metodológica confirma o importante efeito da ninhada que pode acontecer em estudos sobre os efeitos do estresse peri-natal.

O enfoque de nossos estudos recai na comparação dos efeitos da PM, imposta nos DPN 3 ou 11, sobre comportamentos emocionais avaliados na idade adulta (além do estudo descrito acima em adolescentes). Estas idades foram escolhidas por dois motivos: 1) o DPN 3 precede o início do PHRE e o DPN 11 ainda encontra-se no vale do PHRE, portanto, imaginamos que alterações na secreção basal de CORT possam produzir efeitos

diferentes em fases claramente distintas quanto ao desenvolvimento do SNC; 2) com base nos trabalhos de van Oers (1997 e 1998a) e Suchecki & Tufik (1997) que mostram que a PM pode gerar, pelo menos no início da adolescência, respostas de estresse antagônicas quando imposta nesses dias (em PND 3 produz hiperresponsividade e em DPN 11, hiporresponsividade), pretendíamos explorar a possibilidade de que essa adversidade pudesse resultar em fenótipos comportamentais distintos.

Começamos, então, desafiando os animais adultos, machos e fêmeas, PM3 e PM11 com injeção de salina hipertônica, um estressor físico, para confirmar se as respostas de ACTH e CORT seriam diferentes. Construímos uma curva tempo-resposta para os dois hormônios (basal, 10, 30 e 60 min pós-estresse) e um macho e uma fêmea de cada ninhada foram utilizados para cada tempo. Os machos PM11 exibiram uma clara hiporresponsividade do ACTH ao estressor, quando comparados aos machos PM3. Porém, nenhum dos grupos experimentais diferiu do grupo CTL. As fêmeas não apresentaram tal diferença, embora aos 10 min, o grupo PM11 não tenha exibido o pico de secreção característico e que foi evidente nos outros dois grupos. Quanto às concentrações de CORT, os machos PM11 apresentaram uma tendência a secretar menos o esteroide do que os outros grupos e as fêmeas exibiram um perfil muito semelhante entre si. Quando avaliamos o comportamento do tipo-ansioso desses animais, tanto em testes que avaliam o “traço” (caixa de exploração livre (Calatayud et al., 2004)) quanto o “estado” ansioso (caixa de transição claro-escuro (Chaouloff et al., 1997)), observamos que ambos os grupos manipulados machos e fêmeas apresentavam aumento do comportamento do tipo-ansioso “estado” (Faturi et al., 2010). Subsequentemente utilizamos um protocolo experimental semelhante, porém os animais adultos PM3 e PM11, machos e fêmeas foram expostos ao LCE. Amostras de sangue, obtidas por uma incisão na cauda, foram coletadas de cada animal no dia anterior ao teste (basal) e 15, 30 e 60 min após o teste. Animais não expostos ao LCE foram decapitados e os encéfalos foram removidos para quantificação de monoaminas e neurotransmissores aminoácidos no HPC desses animais. Embora no artigo não tenhamos incluído os resultados dos grupos PM3, os comportamentos foram idênticos aos dos grupos PM11. Ambos os grupos e ambos os sexos exibiram aumento do comportamento do tipo-ansioso. Quanto às concentrações de CORT, tanto os machos quanto as fêmeas PM11 secretaram progressivamente mais hormônio, enquanto que os respectivos grupos CTL mostraram perfil de retorno aos valores basais. A PM no DPN 11 não afetou as concentrações hipocâmpais de monoaminas; entretanto a análise dos

neurotransmissores inibitórios revelou um fato surpreendente: machos CTL exibiram altas concentrações de Taurina, que foram reduzidas pela PM; fêmeas CTL, por sua vez, exibiram altas concentrações de GABA, que foram reduzidas pela PM. Quanto às concentrações de Glutamato e Aspartato não observamos alterações marcantes. Ao fazer a razão matemática entre as concentrações de aminoácidos excitatórios e inibitórios, observamos que a PM produziu um desequilíbrio voltado para maior excitação no HPC destes animais, o que sugere que os mesmos possam estar mais sujeitos à excitotoxicidade desencadeada por excesso de neurotransmissores excitatórios (Barbosa Neto et al., 2012).

Posteriormente, repetimos esse protocolo com o objetivo de examinar se a PM nos DPN 3 ou 11 também poderia gerar perfil de comportamento do tipo-depressivo e analisar as monoaminas em várias regiões do encéfalo associadas à neurobiologia da ansiedade e depressão. Assim, as ninhadas foram compostas por 6 machos, dos quais a metade foi submetida ao protocolo de ECM por 4 semanas e a outra metade foi alojada individualmente, de modo que foram constituídos seis grupos: CTL-ECM, CTL-não ECM (NECM), PM3-ECM, PM3-NECM, PM11-ECM e PM11-NECM. Durante o período de estresse a preferência por sacarose foi avaliada (lembrando que a redução da preferência reflete comportamento de anedonia) e ao final desse período de avaliação, um ou dois animais de cada ninhada foi exposto ao LCE. Amostras de sangue foram obtidas da cauda imediatamente antes (basal) e 30 min pós-LCE. Aos 60 min pós-LCE as amostras foram obtidas por decapitação e os encéfalos foram dissecados em polo frontal, AMI, HPC ventral e dorsal e hipotálamo para quantificação das monoaminas, NA, DA, 5-HT. Os resultados mostraram que:

1) Machos adultos PM11 apresentaram menor ganho de peso

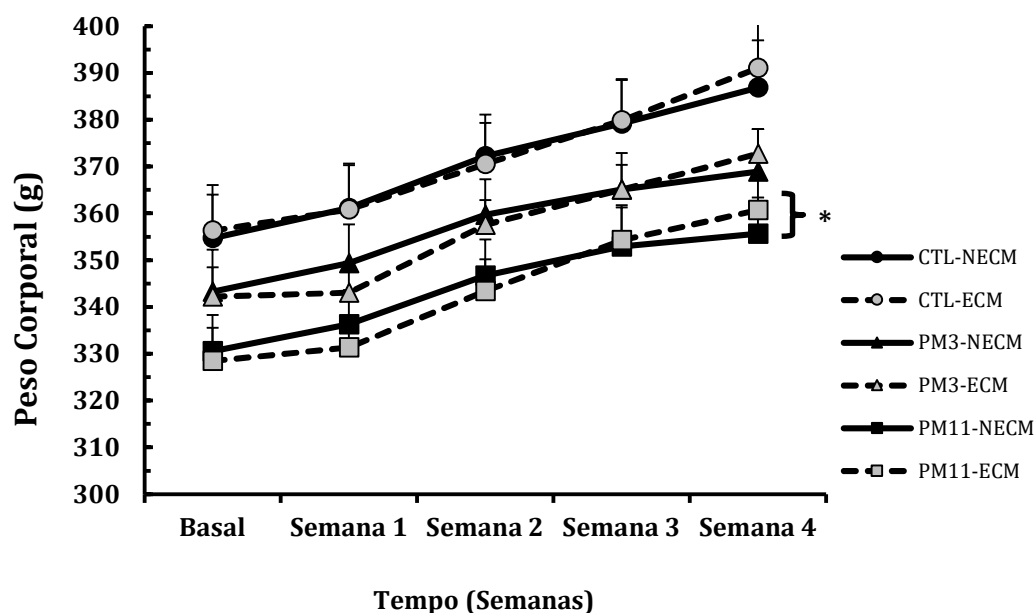


Figura 4.12 - Peso corporal (g) dos grupos CTL-NECM (n=16), CTL-ECM (n=19), PM3-NECM (n=18), PM3-ECM (n=21), PM11-NECM (n=19) e PM11-ECM (n=21) ao longo de quatro semanas. Dados apresentados em média \pm erro padrão * - Diferença em relação ao respectivo grupo CTL.

2) O estresse crônico moderado induziu anedonia em todos os grupos

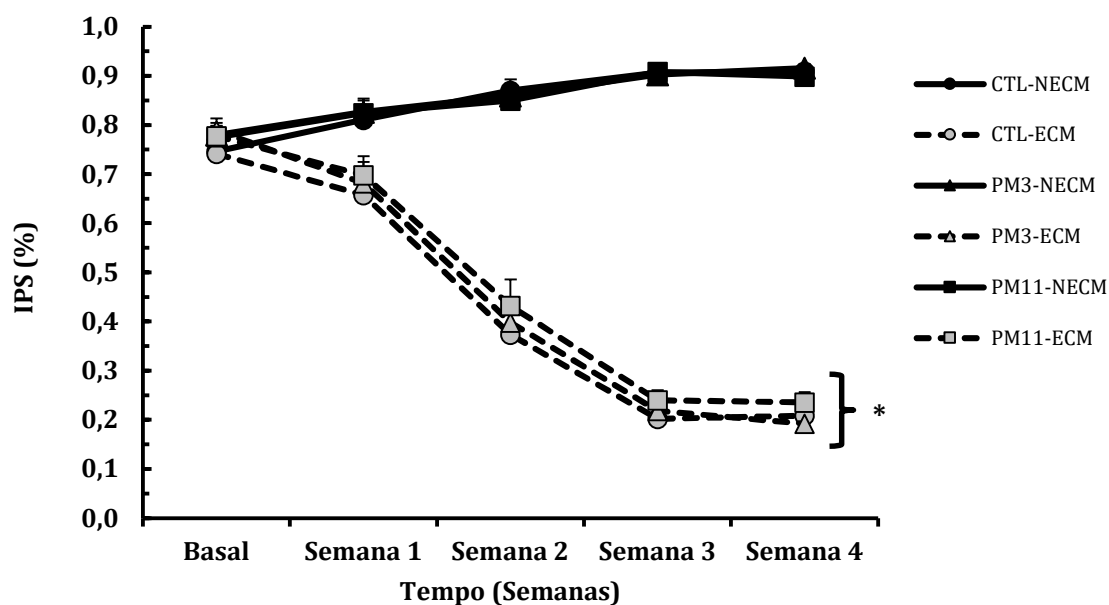


Figura 4.13 - Índice de preferência por sacarose (IPS) dos grupos CTL-NECM (n=16), CTL-ECM (n=19), PM3-NECM (n=18), PM3-ECM (n=21), PM11-NECM (n=19) e PM11-ECM (n=21) ao longo de quatro semanas. Dados apresentados em média \pm erro padrão * - Diferença em relação aos respectivos grupos NECM.

3) Ratos PM11 não submetidos ao ECM visitaram mais os braços abertos do LCE

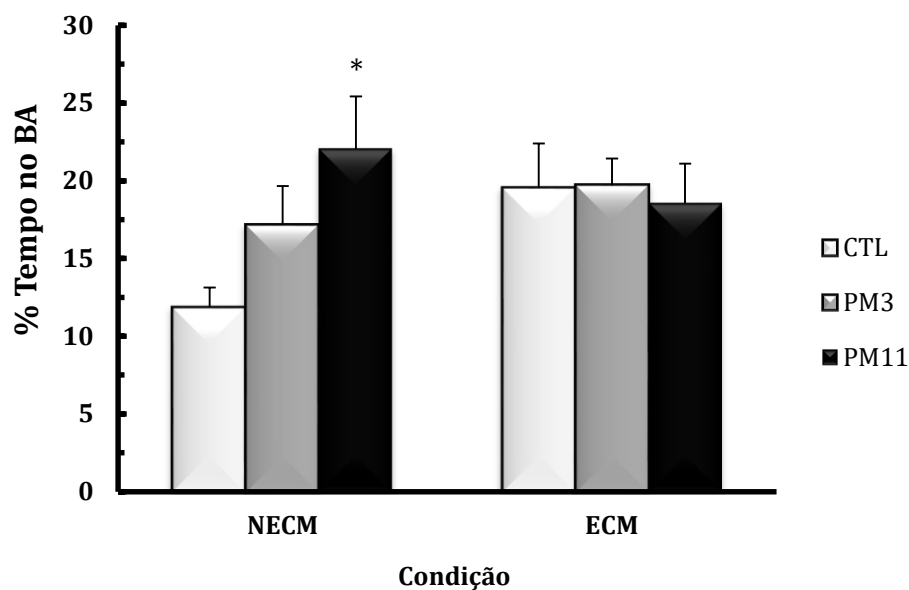


Figura 4.14 – Porcentagem de tempo de permanência no braço aberto (BA) de animais CTL-NECM (n=11), CTL-ECM (n=13), PM3-NECM (n=13), PM3-ECM (n=13), PM11-NECM (n=13) e PM11-ECM (n=13). Dados apresentados em média \pm erro padrão da %TBA. * - Diferença em relação ao respectivo grupo CTL.

4) Ratos PM3 e PM11 não submetidos ao ECM apresentaram menos comportamento de avaliação de risco

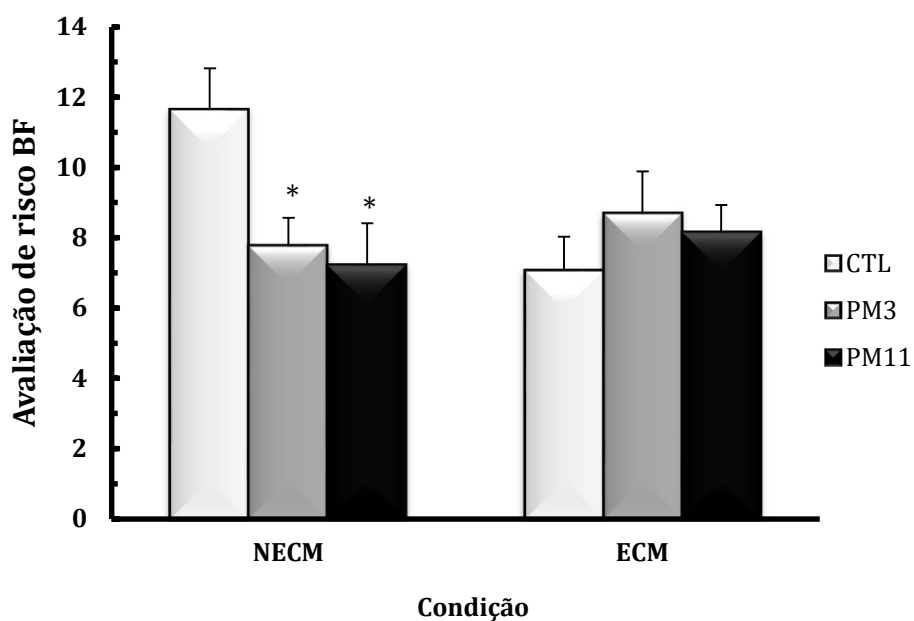


Figura 4.15 – Frequência de comportamento de avaliação de risco no braço fechado (BF) de animais CTL-NECM (n=11), CTL-ECM (n=13), PM3-NECM (n=13), PM3-ECM (n=13), PM11-NECM (n=13) e PM11-ECM (n=13). Dados apresentados em média \pm erro padrão * - Diferença em relação ao respectivo grupo CTL

4) Ratos submetidos ao ECM apresentaram maiores concentrações de CORT do que os NECM e os ratos PM11 secretaram CORT de forma sustentada

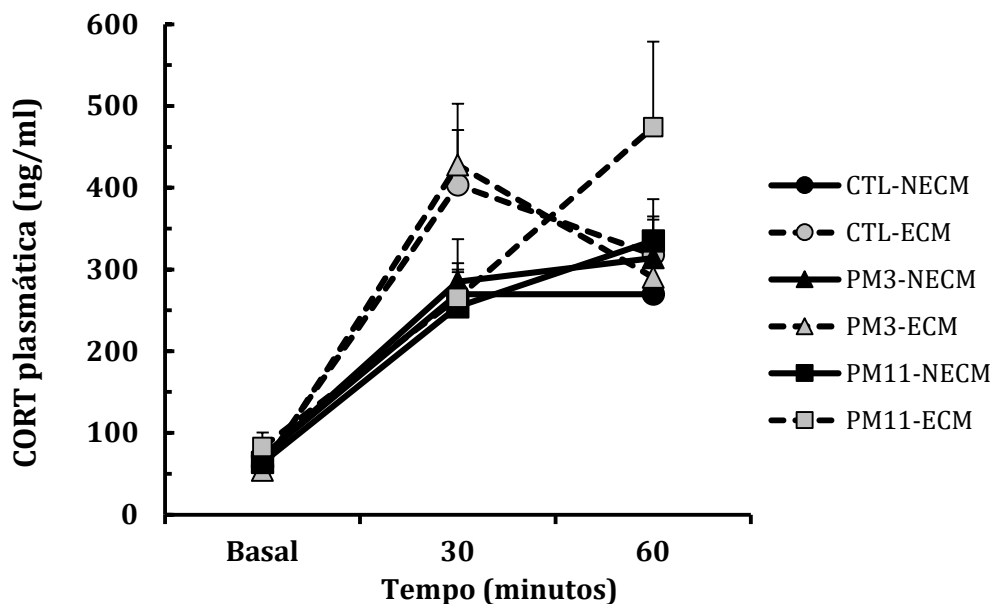


Figura 4.16 – Concentração plasmática de corticosterona (ng/ml) dos grupos CTL-NECM (n=12), PM3-NECM (n=13) e PM11-NECM (n=13) e CTL-ECM (n=13), PM3-ECM (n=13) e PM11-ECM (n=13) ao longo de sessenta minutos. Dados apresentados em média \pm erro padrão

5) Ratos PM3 e PM11 não submetidos ao ECM exibiram menores concentrações de NA (tendência) e de 5-HT na AMI

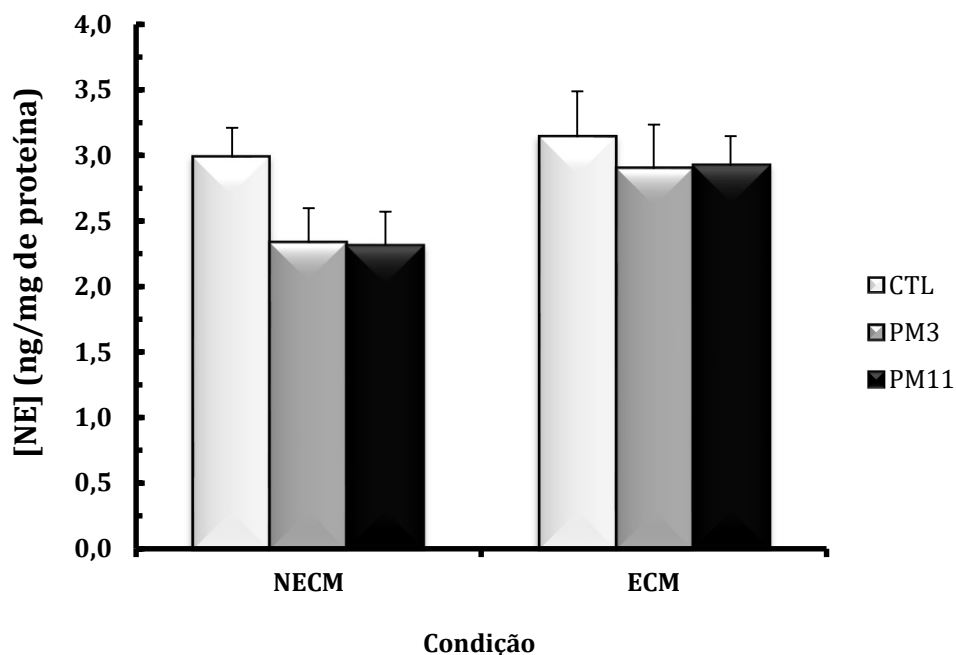


Figura 4.17 – Concentração de noradrenalina (ng/mg de proteína) na amígdala de animais CTL-NECM (n=11), CTL-ECM (n=12), PM3-NECM (n=13), PM3-ECM (n=11), PM11-NECM (n=10) e PM11-ECM (n=13). Dados apresentados em média \pm erro padrão da concentração.

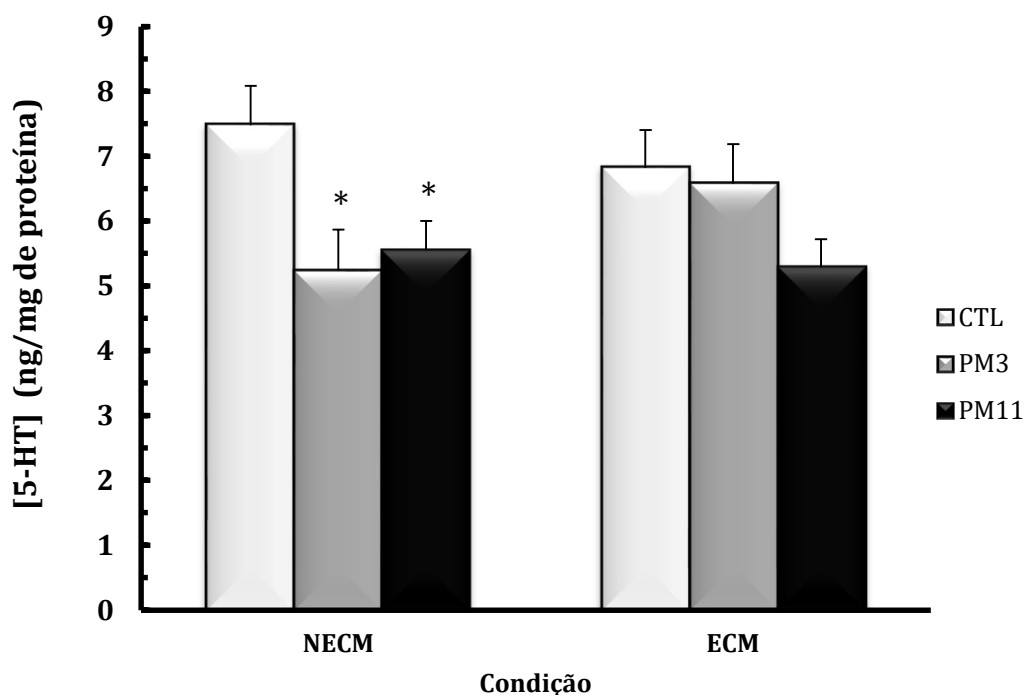


Figura 4.18 – Concentração de serotonina (ng/mg de proteína) na amígdala de animais CTL-NECM (n=11), CTL-ECM (n=12), PM3-NECM (n=13), PM3-ECM (n=11), PM11-NECM (n=10) e PM11-ECM (n=13). Dados apresentados em média \pm erro padrão. * -Diferença em relação ao respectivo grupo CTL.

Os resultados hormonais obtidos nos estudos de Barbosa Neto e colaboradores (2012) e no presente (Dissertação de Mestrado de Karina Kores Dorsa, dados não publicados) podem ser interpretados de duas formas: os animais PM11 exibem deficiência na regulação da atividade do eixo HPA, pois aos 60 min os valores de CORT ainda são maiores do que nos outros tempos, ao passo que em animais CTL esses valores parecem iniciar o retorno ao basal. No entanto, o teste de supressão à DEXA, realizado em ratos machos PM3 e PM11 mostra que a PM não altera a capacidade do GC sintético em inibir o eixo HPA (Faturi et al., 2010), o que refuta essa hipótese. A segunda possibilidade é que os animais PM11 sejam mais reativos à coleta de sangue pela cauda, que pode representar um estressor adicional. Esta explicação parece ser mais aceitável, em vista do perfil de secreção obtido em animais que foram eutanasiados em cada tempo avaliado e que aos 60 min pós-estressor apresentaram concentrações iguais às concentrações basais (Faturi et al., 2010).

Quanto ao comportamento do tipo-ansioso, a principal diferença metodológica entre o presente estudo e o anterior é o fato de que os animais NECM foram alojados individualmente por 6 semanas (2 semanas de habituação e 4 semanas para avaliação da preferência por sacarose). O alojamento individual é considerado um estressor moderado

(Bartolomucci et al., 2003; Giralt and Armario, 1989; Mormède et al., 1990) e, de acordo com a hipótese *match/mismatch* poderia ter favorecido os animais submetidos ao estresse neonatal, que estariam, dessa forma, mais aptos a enfrentar situações posteriores de estresse (caso do LCE que representa estresse de novidade). O aumento do tempo de permanência nos braços abertos do LCE é interpretado como redução do comportamento do tipo-ansioso. Porém, poderia ser interpretado, alternativamente, como aumento de comportamento impulsivo. Entretanto, os resultados neuroquímicos reforçam a primeira alternativa, pois numerosos estudos demonstram que a redução de 5-HT na amígdala é um substrato neuronal para o efeito ansiolítico de vários compostos utilizados para essa finalidade (Carli et al., 1989; Dringenberg et al., 1998). Segundo a teoria dualista proposta por Deakin & Graeff (Graeff, 1993; Graeff et al., 1996) a liberação do neurotransmissor na amígdala pelos terminais originados no NDR aumenta a ansiedade, enquanto que sua liberação na substância cinzenta periaquedutal inibe o medo condicionado. Evidências adicionais sobre a relação das concentrações de 5-HT na AMI e o comportamento ansioso incluem estudos em que a infusão intra-NDR de agonista do receptor 5-HT_{1A}, reduz a evitação do braço aberto no labirinto em T (efeito ansiolítico), semelhante ao que é observado com a administração de diazepam (Graeff et al., 1996) e aumenta a % de tempo despendido nos braços abertos do LCE (File and Gonzalez, 1996). Os receptores 5-HT_{1A} localizados no NDR e no NMR são auto-receptores que, quando ativados, produzem redução das concentrações de 5-HT na amígdala ou no hipotálamo (Graeff, 1993), respectivamente. Evidências adicionais a respeito da função mediadora da 5-HT no controle da ansiedade vêm de estudos em que a lesão eletrolítica do NMR produz efeito ansiolítico (Andrade et al., 2004), infusão aguda de fluoxetina na AMI, que, portanto, produz aumento das concentrações de 5-HT pela inibição da recaptação do neurotransmissor, aumenta comportamento tipo-ansioso (Ravinder et al., 2011) e ratos que apresentam aumento das concentrações de 5-HT na amígdala direita são mais ansiosos no LCE (Andersen and Teicher, 1999).

5. Privação de Sono REM

Uma nova modalidade de estressor?

O sono é um comportamento cíclico, repetitivo e essencial para a vida, como demonstrado em 1894 por Marie de Manacéine que, utilizando filhotes de cães, relatou que 4 a 6 dias de privação de sono eram suficientes para levá-los à morte, enquanto que o óbito só ocorria após 20 a 25 dias de privação alimentar. Ao final do experimento, os cãezinhos apresentavam profunda hipotermia, e à autopsia, redução do número de hemácias e hemorragias capilares na substância cinzenta do encéfalo. De Manacéine concluiu que “a ausência total de sono é mais fatal para os animais do que a ausência total de alimento” (Bentivoglio and Grassi-Zucconi, 1997).

Talvez por causa de sua indiscutível importância para a sobrevivência, várias funções são atribuídas ao sono, entre as quais podem ser citadas funções envolvidas com a manutenção de aspectos homeostáticos, como balanço energético (Bergmann et al., 1989; Koban and Swinson, 2005; Spiegel et al., 1999; Spiegel et al., 2004), termorregulação (Landis et al., 1992; Prete et al., 1991), atividade do sistema imunológico (Everson et al., 2008; Renegar et al., 1998), e funções envolvidas com aspectos cognitivos, como emoção (Walker and van der Helm, 2009), aprendizado e memória (Gais and Born, 2004; Gais et al., 2006). Muitas dessas funções foram inferidas pela supressão do sono e avaliação de suas consequências. Assim, a privação de sono total ou a PSREM são abordagens amplamente utilizadas para essa finalidade.

5.1. Características do sono em seres humanos e em ratos

O tempo médio de sono para a maioria da população humana é de cerca de 8 h diárias. Historicamente considerado como um estado passivo, de consciência parcial e inatividade de praticamente todos os músculos voluntários, o sono foi re-conceitualizado após o advento do eletroencefalograma (EEG), quando os registros da atividade cerebral durante este período demonstraram intensa e distinta atividade elétrica.

O sono humano distingue-se em duas fases principais: o sono não-REM (NREM) e o sono REM, sendo que o sono NREM, por sua vez é subdividido em três estágios:

- Estágio 1 (N1), compreende 3 a 8% do tempo total de sono e ocorre com maior frequência na transição entre a vigília e o sono, ou após breves despertares.
- Estágio 2 (N2), inicia-se aproximadamente 10 a 12 min após N1 e compreende de 45 a 55% do tempo total de sono.
- Estágios 3 e 4 (N3), ocupam 15 a 20% do tempo total de sono e são também conhecidos como sono delta ou SOL.

- SREM compreende cerca de 20 a 25% do tempo total de sono, sendo que o primeiro episódio ocorre em torno de 60 a 90 min após o início do sono.

Os ciclos de sono, compostos pelo sono NREM-REM, têm duração média de 90 min e se repetem de quatro a seis vezes por noite (Dement, 1960), sendo que N3 predomina no primeiro terço enquanto que o SREM predomina no último terço da noite; o primeiro episódio de SREM tem duração de poucos minutos e com a progressão do sono, esses episódios tornam-se mais longos. (Rama et al., 2009).

O sono dos roedores e, no caso específico desta tese, de ratos albinos, caracteriza-se por ser polifásico e predominantemente diurno. Os ciclos de sono têm duração de, aproximadamente, 10 a 13 min (Trachsel et al., 1991), quando ocorre um breve despertar, cuja provável função é explorar o ambiente em busca de pistas da presença de predadores (Andersen and Hoshino, 2008).

5.2. Métodos utilizados para induzir privação de SREM

Com a descoberta do SREM por Aserinski e Kleitman, em 1953, deu-se início a uma série de estudos envolvendo a privação seletiva dessa fase do sono. Uma das primeiras descobertas mostrava que quando o indivíduo era acordado durante o SREM lembrava-se claramente dos detalhes de um sonho, o que levou vários autores a se referirem a essa fase como sono dos sonhos. Em um relato detalhado, William Dement descreveu o primeiro experimento sobre PSREM, realizado com seres humanos. Neste primeiro estudo, o sono de oito voluntários foi monitorado por 20 a 30 noites consecutivas, incluindo um período de monitoramento basal de sono, após o qual os voluntários foram submetidos a várias noites de PSREM (variando de 3 a 7 noites), seguidas por um período no qual os voluntários puderam dormir normalmente por alguns dias. Depois desse período de recuperação os voluntários foram novamente submetidos à privação de sono não-REM, perfazendo o mesmo número de vezes necessárias para acordar o indivíduo durante o mesmo número de noites utilizadas na etapa de PSREM. Em suas próprias palavras, Dement escreveu que “Nas primeiras noites de privação dos sonhos, o retorno ao sono geralmente de iniciava com um novo ciclo, e o próximo período de sonho era adiado pelo tempo esperado. Entretanto, nas noites subsequentes o número de despertares forçados necessários para suprimir o sonho aumentou progressivamente.” Além disso, na primeira noite de recuperação, o tempo despendido em SREM foi, em média, 50% maior do que na noite basal, indicando um claro **rebote de SREM**.

Interessante é que a fase de privação de sono NREM não gerou nenhuma das alterações descritas acima, demonstrando especificidade para essa fase do sono (Dement, 1960).

Em ratos, os resultados são muito semelhantes. O número de intervenções para impedir a ocorrência de SREM aumenta progressivamente entre 1 e 3 dias de privação, sendo que após o 3º dia não é possível evitar o SREM sem interferir também com o SOL. É como se a pressão para dormir o SREM fosse tão forte, que após algum tempo torna-se impossível evitar que este aconteça (Morden et al., 1967). O rebote de SREM é claramente observado em ratos (Machado et al., 2004; Mendelson et al., 1974; Morden et al., 1967), sendo que a magnitude do rebote é tanto maior quanto mais longa for a privação de sono (Vogel, 1993).

Para o estudo de privação de sono total ou de SREM, foram desenvolvidos diversos métodos, dentre os quais, os mais utilizados são:

a. Disco Giratório (Rechtschaffen et al., 1983): dois animais (um privado de sono total e outro CTL ou “parelha”) são colocados sobre um disco giratório. Por meio do registro polissonográfico, um computador é acionado toda vez que o rato experimental inicia a fase de sono que se deseja suprimir, liberando a rotação do disco. Assim, o animal experimental precisa andar no sentido contrário ao da rotação do disco para não cair na água. O animal-parelha também terá que se locomover podendo ser acordado, porém em alguma fase inespecífica do sono (Figura 5.1). Este método permite também a privação seletiva de SREM.

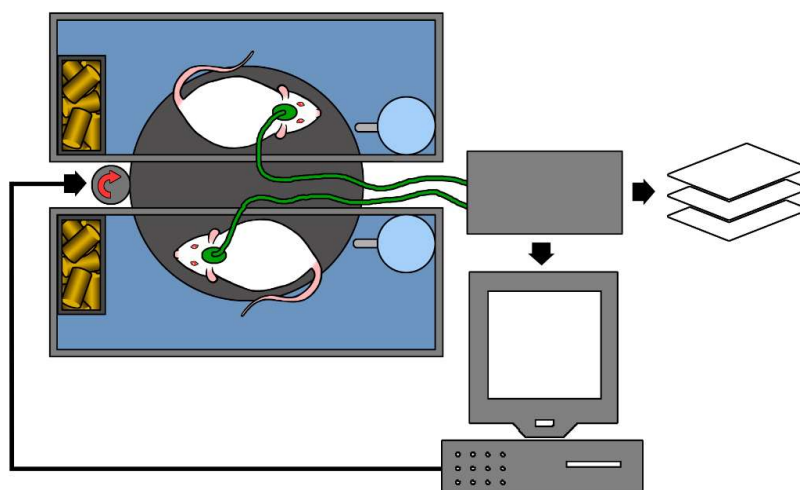


Figura 5.1 – Representação do Disco giratório, utilizado para produzir privação de sono total ou de sono REM. Neste aparato, os animais, experimental e par, estão conectados a um polígrafo e o ciclo sono-vigília é monitorado continuamente. Quando o animal experimental inicia o sono, a rotação do disco é acionada e ambos os animais iniciam a ambulação para evitar que caiam na água que se localiza nas bandejas abaixo do disco (representadas pelos retângulos azuis). Esquema modificado de (Rechtschaffen et al., 1983). Desenho de autoria de Lia Assae Esumi.

b. Esteira (Guzman-Marin et al., 2003): após implantação de eletrodos para registro polissonográfico, os animais são colocados em uma esteira que se move por 3 s e fica desligada por 12 s, de forma a impedir que o animal durma. Os animais do grupo CTL são alojados sobre a esteira com ajuste de ciclos mais longos, de modo que os mesmos estarão em atividade por 15 min e em repouso por 60 min; assim, a distância percorrida pelos animais de ambos os grupos é igual, porém o grupo CTL pode repousar efetivamente. Neste modelo a porcentagem de vigília nos animais privados de sono é de aproximadamente 92%, e dos animais CTL de esteira, de 60%, enquanto que animais mantidos na gaiola exibem, em média, 50% de vigília. Este método também permite a privação seletiva de SREM.

c. Tambor rotatório (Tobler and Jaggi, 1987): Os protocolos que utilizam esse método variam no que tange a velocidade de rotação dos tambores. Os tambores, que possuem 40 cm de diâmetro podem ser ajustados para girar uma rotação por min (Meerlo et al., 2002; Barf et al., 2012) ou a cada 2,5 min (Sgoifo et al., 2006), continuamente, por um período pré-estabelecido. Em estudos que envolvem a restrição de sono, os animais permanecem em suas gaiolas-moradia por 4 h e nos tambores giratórios por 20 h por dia.

d. Gentle-handling: Este método vem sendo utilizado nas duas últimas décadas por vários grupos, com o objetivo de produzir privação de sono de curta duração, em torno de

2 a 6 h (Frank et al., 1998; Grossman et al., 2000; Mistlberger et al., 2003; Tobler and Jaggi, 1987; Toth et al., 1995). Essa técnica pode ser utilizada em diversas espécies, como ratos, camundongos, hamsters e gatos, e consiste na aplicação de manipulações delicadas, com a ponta de um pincel ou outro objeto macio, de modo a evitar que o animal durma, mas de forma a produzir o menor estresse possível (físico ou psicológico).

e. Método da plataforma única: Este método foi utilizado por Jouvét e colaboradores (Jouvét et al., 1964) para realizar o primeiro estudo de privação seletiva de SREM em animais. É um método muito simples, mas muito engenhoso que se baseia na atonia muscular característica do SREM. Com essa ideia em mente, um gato foi alojado sobre um vaso de flor invertido, circundado por água. Cada vez que o animal iniciava o SREM, perdia o tônus muscular e o equilíbrio postural, caindo na água e sendo acordado. Em 1965 esse método foi adaptado para ratos (Cohen and Dement, 1965), com a utilização de uma plataforma com 6,5 cm de diâmetro (Figura 5.2). O registro de sono dos animais durante o período de privação deixou claro que esse método produzia supressão completa de SREM e, durante o período de recuperação, observava-se um rebote substancial dessa fase do sono (Jouvét et al., 1964; Landis, 1996; Machado et al., 2004; Morden et al., 1967). Em geral, o grupo CTL é composto por animais alojados sobre uma plataforma mais larga, com 14 cm de diâmetro. Acredita-se que o animal alojado sobre essas plataformas mais largas sejam capazes de dormir, por não caírem na água com a ocorrência do relaxamento muscular. Contudo, sabemos que esse grupo também perde cerca de 50% de SREM e, conseqüentemente, apresenta um rebote considerável dessa fase do sono no primeiro dia de recuperação pós-privação (Landis, 1996; Machado et al., 2004; Porkka-Heiskanen et al., 1995).

Atualmente, utilizamos em nossos estudos um grupo controle em que os animais são alojados, individualmente, nos mesmos recipientes utilizados para a PSREM, porém, ao invés de água, o recipiente é preenchido com forração (sabugo de milho). Dessa forma, os animais podem dormir normalmente, porém são submetidos ao mesmo nível de luminosidade do que os animais do grupo experimental e permanecem sozinhos durante o período de privação de sono.

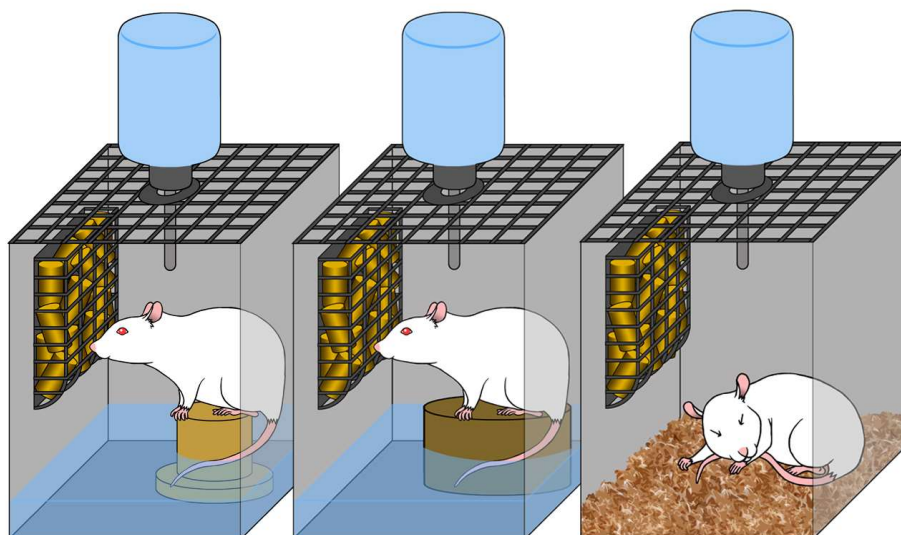


Figura 5.2 – Método da plataforma única, em que o animal pode ser alojado em 3 ambientes diferentes. À esquerda, o animal é colocado sobre uma plataforma de 6,5 a 7,0 cm de diâmetro; o painel do meio mostra o animal sobre uma plataforma larga, de 14 cm (controle de ambiente); à direita, o animal é colocado no mesmo recipiente, porém este é preenchido com forração, o que permite que o animal durma normalmente. Desenho de autoria de Lia Assae Esumi.

Embora esse método seja extremamente prático, fácil e efetivo para produzir PSREM, contém alguns fatores que são utilizados como estressores em experimentação animal: REST e alojamento individual. Devido às características inerentes a esse método, muitos estudiosos do sono questionam se as consequências da PSREM são devidas à supressão desta fase do sono ou à exposição dos animais a esses estressores. De fato, observa-se que alguns estressores aplicados por longos períodos promovem efeitos comportamentais semelhantes aos da PSREM, como é o caso da inibição do comportamento de bocejo (22 h de imobilização/dia, por 4 dias) (Tufik et al., 1995) e a redução das concentrações plasmáticas de testosterona (Andersen et al., 2004). Portanto, novas abordagens foram elaboradas, com o objetivo de reduzir os efeitos do estresse e assim evidenciar com mais objetividade os efeitos da PSREM.

f. Método das Plataformas múltiplas (van Hulzen and Coenen, 1981): neste método um animal é colocado em um tanque contendo sete plataformas, evitando-se assim, que esteja submetido à REST; o animal, entretanto, permanece sozinho.

g. Método Modificado das Plataformas Múltiplas (Suchecki and Tufik, 2000): Com o objetivo de evitar o alojamento individual e a REST inerentes aos métodos mencionados anteriormente, Nunes Jr. e Tufik (Nunes Junior and Tufik, 1994) propuseram uma nova técnica, em que vários animais (geralmente 10) eram colocados sobre 14 plataformas,

dentro de um grande tanque, contendo água. Os efeitos comportamentais produzidos pela técnica da plataforma única e por esta técnica eram semelhantes. No entanto, ao comparamos as concentrações plasmáticas de ACTH e CORT dos animais privados pelo método da plataforma única com aqueles privados por este método, observamos que todos os grupos experimentais, inclusive aqueles alojados sobre plataformas largas, liberaram mais ACTH do que o grupo controle mantido na gaiola-moradia. Quanto às concentrações de CORT, estas estavam elevadas somente nos animais submetidos ao método novo, sugerindo que essa técnica poderia ser ainda mais estressante do que a da plataforma única (Suchecki et al., 1998). É importante ressaltar que neste método os animais alojados, como um grupo, no tanque eram provenientes de gaiolas diferentes e, portanto, poderiam estar sob outro potente estressor, a instabilidade social. Por isso, desenvolvemos uma metodologia na qual de 6 a 10 animais, criados juntos desde o desmame, são alojados sobre várias plataformas (em número superior ao de animais) no interior de um tanque contendo água. Propusemos também a utilização de uma grade no interior do tanque que permitiria que os animais dormissem no mesmo ambiente do que os animais privados de sono (mesmos níveis de luminosidade, umidade e temperatura), constituindo, assim o grupo controle (Figura 5.3). A análise do padrão de sono pós-90 h de PSREM por esse método mostrou um que os animais apresentaram rebote de SREM de 164% e uma pequena, porém significativa, redução no SOL (12,2%), comparado com os valores basais. Os ratos alojados sobre plataformas largas apresentam um rebote de SREM de 91%, enquanto que aqueles colocados sobre a grade não apresentam rebote de sono (Suchecki et al., 2000a).

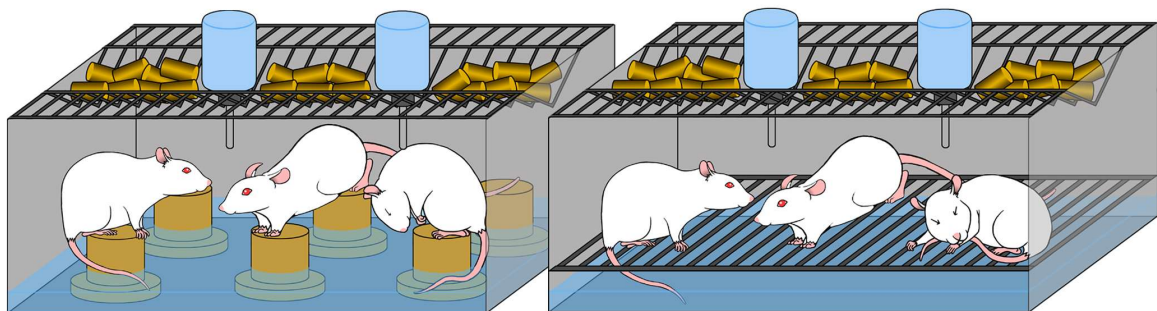


Figura 5.3 – Desenho esquemático do método modificado das plataformas múltiplas (à Esquerda) e a utilização da grade, como controle ambiental (à Direita). Observe que os animais sobre as plataformas conseguem dormir as fases mais superficiais do sono, interagem com outros animais e movimentam-se sobre as plataformas. Esse esquema foi baseado em fotografias tiradas no laboratório de privação de sono do Departamento de Psicobiologia. Desenho de autoria de Lia Assae Esumi.

Na comparação do grau de privação de sono por 96 h produzido pelos métodos da plataforma única e o das plataformas múltiplas e do rebote de sono subsequente observa-se que ambos os métodos eliminam o SREM, além de reduzir também o SOL em cerca de 40%, embora nas primeiras 24 h de recuperação ocorre apenas rebote de SREM. Neste estudo também fica evidente que o controle das plataformas largas não é o mais adequado, visto que ocorre significativa supressão de SREM, embora em menor grau, e subsequente rebote desta fase do sono (Machado et al., 2004). Ademais, outros estudos já haviam mostrado que as alterações produzidas em animais mantidos em plataformas largas são intermediárias entre os grupos submetidos às plataformas estreitas e o controle de gaiola (Brock et al., 1994; D'Almeida et al., 1997; Tufik et al., 1978).

Os métodos da plataforma única e modificado das plataformas múltiplas também são utilizados para produzir restrição de sono e o protocolo consiste em manter os animais no ambiente de privação de sono por 18 h (entre as 16:00 h e 10:00 h) e em suas gaiolas-moradia durante 6 h (entre 10:00 h e 16:00 h), por um período de 21 dias (Machado et al., 2005).

5.3. Privação de SREM e ativação das respostas de estresse

Ainda hoje se discute a validade dos estudos de privação de SREM para replicar as consequências das patologias do sono em seres humanos. O argumento de que em seres humanos esta condição inexistente e que, portanto, o emprego destes métodos não se justifica pode ser refutado pelos exemplos obtidos com pacientes apnêicos, que apresentam claro prejuízo do tempo de sono despendido em SOL e SREM e significativo rebote dessas fases do sono após tratamento apropriado (Aldrich et al., 1989; Bittencourt et al., 2001; Brillante et al., 2012; Issa and Sullivan, 1986). Ademais, estudos com pacientes apnêicos ou insones, demonstram fortes indícios de que prejuízos na qualidade do sono representam um estímulo estressor, uma vez que produzem aumento nas concentrações de adrenalina (Vgontzas et al., 1998), de ACTH e cortisol (Vgontzas et al., 2001) e prejuízo do *feedback* negativo do cortisol, avaliado pelo teste de supressão à DEXA (Carneiro et al., 2008). Mesmo em estudos experimentais com voluntários sadios submetidos a sete dias de restrição de sono (4 h de sono por noite, de 1:00 h às 5:00 h) observa-se aumento da atividade do sistema nervoso simpático e das concentrações plasmáticas e salivares de cortisol (Spiegel et al., 1999). A privação de sono de voluntários sadios por 24 h também resulta em aumento das concentrações de cortisol na noite seguinte ao evento (quando os

valores deveriam ser baixos), indicando prejuízo do *feedback* negativo do cortisol (Leproult et al., 1997).

Além das consequências diretas da privação e/ou da restrição de sono sobre os sistemas de resposta ao estresse, existe uma vasta literatura a respeito das consequências indiretas que poderiam, em última instância, precipitar transtornos mentais, como vem sendo proposto por alguns autores (Chang et al., 1997; Riemann and Voderholzer, 2003). Estudos experimentais que utilizam restrição de sono (20 h de privação de sono x 4 h de sono por dia, por 8 dias) mostram que esse protocolo produz dessensibilização dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} cuja recuperação da sensibilidade só ocorre após uma semana de sono normal (Roman et al., 2005b). Esse efeito não é mediado pelos GCs, pois persiste em animais submetidos à ADX (Roman et al., 2006b). Esse protocolo também induz desregulação do eixo HPA, com redução das concentrações de ACTH e aumento da secreção de CORT, indicando redução da densidade ou da funcionalidade de CRHR1. Pelo menos a PSREM por 72 h reduz a densidade desses receptores na hipófise (Fadda and Fratta, 1997). Confirmando essa hipótese, Novatti e colaboradores demonstraram que a administração periférica de CRH ovino, que neste caso só pode atuar na hipófise, já que o CRH não atravessa a barreira hemato-encéflica, resultou em menor liberação de ACTH do que em animais CTL, sem diferença nas concentrações de CORT. Esta relação entre as concentrações de ACTH e CORT reforçam a ideia de que a PSREM também aumenta a sensibilidade dos receptores para ACTH nas glândulas adrenais (Novati et al., 2008). Resultados semelhantes relativos ao aumento da sensibilidade das glândulas adrenais foram obtidos com animais privados de SREM e desafiados com injeção de salina (Suchecki et al., 2002b) ou com estressor psicológico – exposição ao LCE (Suchecki et al., 2002a).

O comportamento emocional (comportamento do tipo-ansioso) parece ser influenciado pela PSREM, embora os resultados sejam conflitantes, com relatos de aumento (Sagaspe et al., 2006; Silva et al., 2004) ou redução desse comportamento (Martinez-Gonzalez et al., 2004; Pokk and Väli, 2001; Suchecki et al., 2002a). As razões para essa controvérsia não são claras, mas o uso de diferentes espécies, tempos de privação e aparatos para medir comportamento do tipo-ansioso podem explicá-las.

Recentemente redigimos um capítulo de livro (Suchecki and Tufik, 2011), em que foram relacionados os estudos de privação de sono em animais e a repercussão desse procedimento em índices clássicos de resposta de estresse. Os resultados, dispostos na

Tabela 2, mostram que qualquer método de privação de sono que perdura por mais de 12 h ininterruptas estimula a resposta fisiológica de estresse. Se levarmos em consideração a definição clássica de estresse – ameaça à homeostasia que leva ao recrutamento dos sistemas de resposta para a recuperação do equilíbrio interno – a privação prolongada de sono total ou de SREM só pode ser considerada um evento estressor, pois impedir que o organismo realize uma função tão primordial à vida não pode ser vista de outra forma que não seja esta.

Tabela 2 – Estudos que empregam métodos de indução de privação de sono total ou de SREM e as consequências em aspectos relacionados com a resposta de estresse.

Fonte da informação	Método / Tipo de privação	Duração do protocolo	Parâmetro	Resposta
(Murison et al., 1982)	<ul style="list-style-type: none"> • MPU – PSREM • <i>Handling</i> / privação de sono total (PST) 	24 h	<ul style="list-style-type: none"> • Úlceras gástricas • Concentrações plasmáticas de CORT 	<ul style="list-style-type: none"> • (• ↑
(Tobler et al., 1983)	Locomoção forçada em tambores giratórios / PST	21,5 h e 2,5 h de rebote de sono	<ul style="list-style-type: none"> • Concentrações plasmáticas de CORT 	<ul style="list-style-type: none"> • a • =
(Abel et al., 1983)	MPU / PSREM	72 h e 24h de recuperação de sono	<ul style="list-style-type: none"> • Ligação a receptores β-adrenérgicos corticais 	<ul style="list-style-type: none"> • =
(Coenen and van Luijtelaar, 1985)	<ul style="list-style-type: none"> • Método do pêndulo /PSREM • MPU / PSREM • Plataformas múltiplas / PSREM 	72 h	<ul style="list-style-type: none"> • Peso relativo das adrenais e do timo • Peso corporal • Úlceras gástricas 	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ • c • ↓ • (• =
(Kushida et al., 1989)	Disco giratório / PSREM	Até o óbito	<ul style="list-style-type: none"> • Peso relativo das adrenais • FC 	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ • ↑
(Patchev et al., 1991)	MPU / PSREM	7 a 9 dias	<ul style="list-style-type: none"> • Consumo alimentar • Peso corporal • Temperatura corporal • Concentrações plasmáticas de CORT 	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ • ↓ • ↓ • ↑
(Sallanon-Moulin et al., 1994)	MPU / PSREM	24 h e 4 h rebote de sono	<ul style="list-style-type: none"> • Atividade da Glutamina sintetase • Concentrações plasmáticas de CORT 	<ul style="list-style-type: none"> • c • ↑
(Brock et al., 1994)	MPU / PSREM	96 h	<ul style="list-style-type: none"> • Concentrações de NA • Peso corporal • Consumo alimentar • Tempo de imobilidade no TNF 	<ul style="list-style-type: none"> • c • ↓ • ↑ • ↑
(Porkka-Heiskanen et al., 1995)	MPU / PSREM	8 h, 24 h, 72 h	<ul style="list-style-type: none"> • Concentrações de NA • RNAm para tirosina hidroxilase 	<ul style="list-style-type: none"> • 2 • h • 7
(Fadda and Fratta, 1997)	MPU / PSREM	72 h	<ul style="list-style-type: none"> • Conteúdo hipotalâmico de CRH • Receptores para CRH 	<ul style="list-style-type: none"> • e • h • ↓
(Hipolide et al., 1998)	MMPM / PSREM	96 h	<ul style="list-style-type: none"> • Autorradiografia de receptores α e β cerebrais 	<ul style="list-style-type: none"> • R • ↑ • ol • gi • en • an
(Suchecki et al., 1998)	<ul style="list-style-type: none"> • MPU • Animais misturados no MPM /PSREM 	24h e 96 h	<ul style="list-style-type: none"> • Concentrações plasmáticas de ACTH • Concentrações plasmáticas de CORT 	<ul style="list-style-type: none"> • 2 • ↑
(Suchecki and Tufik, 2000)	MMPM / PSREM	96 h	<ul style="list-style-type: none"> • Concentrações plasmáticas de ACTH • Concentrações plasmáticas de CORT • Peso relativo das adrenais 	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ • ↑ • ↑

(Hairston et al., 2001)	<i>Gentle handling</i> / PST	70, 90, 140 ou 180 min	<ul style="list-style-type: none"> Concentrações plasmáticas de CORT 	↑ em dias
(Campbell et al., 2002)	Locomoção forçada em tambores giratórios / PST	12 h	<ul style="list-style-type: none"> Concentrações plasmáticas de CORT LTP hipocampal 	<ul style="list-style-type: none"> ↑ ↓
(Meerlo et al., 2002)	Locomoção forçada em tambores giratórios / PST	48 h	<ul style="list-style-type: none"> Concentrações plasmáticas de ACTH Concentrações plasmáticas de CORT Resposta à REST 	<ul style="list-style-type: none"> ↑ ↑ ↓
(Pokk and Vali, 2002)	MPU / PSREM	24 h	<ul style="list-style-type: none"> Comportamento do tipo ansioso no labirinto em cruz elevado (LCE) 	↓
(Suchecki et al., 2002a)	MPU e MPPM / PSREM	96 h	<ul style="list-style-type: none"> Comportamento do tipo ansioso no LCE Curso temporal da resposta de ACTH ao LCE Curso temporal da resposta de CORT ao LCE 	<ul style="list-style-type: none"> ↓ ↑ ↑
(Suchecki et al., 2002b)	MPU e MPPM / PSREM	96 h	<ul style="list-style-type: none"> Curso temporal da resposta de ACTH a injeção de salina Curso temporal da resposta de CORT a injeção de salina 	<ul style="list-style-type: none"> ↑ ↑
(Irie et al., 2003)	MPU / PSREM	72 h	<ul style="list-style-type: none"> Resposta de asma imediata Resposta de asma tardia Concentrações plasmáticas de HA Concentrações plasmáticas de adrenalina 	<ul style="list-style-type: none"> ↑ ↑ ↓ ↑
(McDermott et al., 2003)	MPU e MPPM / PSREM	72 h	<ul style="list-style-type: none"> Concentrações plasmáticas de CORT Condicionamento de medo ao contexto Condicionamento de medo clássico 	<ul style="list-style-type: none"> ↑ P =
(Majumdar and Mallick, 2003)	MPU / PSREM	6 dias e 72 h de rebote de sono	<ul style="list-style-type: none"> Quantidade de tirosina hidroxilase (TH) Quantidade de ácido glutâmico descarboxilase (GAD) 	<ul style="list-style-type: none"> ↑ ↑
(Papakonstantinou et al., 2003)	MPU / PSREM	48 h ou 96 h	<ul style="list-style-type: none"> Concentrações plasmáticas de CORT Temperatura corporal TNF-α 	<ul style="list-style-type: none"> ↑ ↑ ↓
(Suchecki et al., 2003)	MPU / PSREM	96 h	<ul style="list-style-type: none"> Concentrações plasmáticas de ACTH Concentrações plasmáticas de CORT Peso relativo das adrenais Peso corporal Consumo alimentar Consumo de sacarose 	<ul style="list-style-type: none"> ↑ ↑ ↑ ↓ ↑ ↑
(Martinez-Gonzalez et al., 2004)	MPM / PSREM	5 dias	<ul style="list-style-type: none"> Tempo nos braços abertos do LCE Tempo no centro do campo aberto Comportamento de congelamento induzido por choque 	<ul style="list-style-type: none"> ↑ ↑ ↓

			<ul style="list-style-type: none"> • Comportamento de enterrar 	• ↓
(Andersen et al., 2005)	MPU / PSREM	96 h e 96 h de rebote de sono	<ul style="list-style-type: none"> • Concentrações plasmáticas de PRL • Concentrações plasmáticas de ACTH • Concentrações plasmáticas de CORT • Concentrações plasmáticas de NA 	• ↑ • ↑ • ↑ • ↑
(Kim et al., 2005)	MPU / PSREM	5 dias	<ul style="list-style-type: none"> • Concentrações plasmáticas de CORT • LTP em CA1 do hipocampo 	• = • ↓
(Cirelli et al., 2006)	Disco giratório / PST	7 dias	<ul style="list-style-type: none"> • Transcritos de genes no córtex cerebral • Proteínas relacionadas à resposta de estresse: proteína 14 relacionada ao fator de inibição do macrófago, proteína de choque térmico 27, cristalina alfa-B 	• ↑ • ↑
(Hipolide et al., 2006)	MPU / PSREM	96 h e 96 h de rebote de sono	<ul style="list-style-type: none"> • Peso corporal • Consumo alimentar • Concentrações plasmáticas de insulina • Concentrações plasmáticas de ACTH • Concentrações plasmáticas de CORT 	• ↓ • ↑ • ↓ • ↑ • ↑
(Koban et al., 2006)	MPU / PSREM	5, 10, 20 dias	<ul style="list-style-type: none"> • Imunorreatividade para CRH • Expressão do RNAm para CRH 	• ↑
(Kopp et al., 2006)	<i>Gentle handling</i> com batidas na gaiola e troca de maravalha / PTS	4 h	<ul style="list-style-type: none"> • Concentrações plasmáticas de CORT 	• =
(Palchykova et al., 2006b)	<i>Gentle handling</i> e troca de maravalha / PTS	6 h	<ul style="list-style-type: none"> • Concentrações plasmáticas de ACTH • Concentrações plasmáticas de CORT 	• ↑ • ↑
(Palchykova et al., 2006a)	<i>Gentle handling</i> / PTS	30 min ou 4 h	<ul style="list-style-type: none"> • Concentrações plasmáticas de ACTH • Concentrações plasmáticas de cortisol 	• = • =
(Sgoifo et al., 2006)	Locomoção forçada em tambores giratórios / PST	48 h	<ul style="list-style-type: none"> • Concentrações plasmáticas de ACTH • Concentrações plasmáticas de CORT • Resposta de ACTH ao estresse • Resposta de CORT ao estresse • Frequência cardíaca 	• ↑ • ↑ • ↓ • = • ↑
(Wada et al., 2006)	<i>Gentle handling</i> com pincel macio / PTS	6 h	<ul style="list-style-type: none"> • RNAm da proteína de choque térmico 70 no hipocampo 	• ↑
(Fenzl et al., 2007)	<i>Gentle handling</i> e tambores giratórios / PTS	6 h	<ul style="list-style-type: none"> • Concentrações plasmáticas de CORT 	• =
(Sanchez-Alavez et al., 2007)	<i>Gentle handling</i> , introdução de objetos novos / PTS	24 h	<ul style="list-style-type: none"> • Concentrações plasmáticas de ACTH • Concentrações plasmáticas de CORT 	• ↑ • ↑

(Everson et al., 2008)	Disco giratório / PTS	5 ou 10 dias	<ul style="list-style-type: none"> Concentrações plasmáticas de CORT 	• =
(Machado et al., 2008)	MPU / PSREM	96 h	<ul style="list-style-type: none"> Concentrações plasmáticas de ACTH Concentrações plasmáticas de CORT Concentrações plasmáticas de PRL Frequência cardíaca 	<ul style="list-style-type: none"> ↑ ↑ ↑ ↑
(Mueller et al., 2008)	MPU e MMPM / PSREM	96 h	<ul style="list-style-type: none"> Concentrações plasmáticas de CORT Neurogênese hipocampal 	<ul style="list-style-type: none"> ↑ ↓
(Tiba et al., 2008a)	MMPM / PSREM	96 h	<ul style="list-style-type: none"> Concentrações plasmáticas de CORT Condicionamento de medo ao contexto 	<ul style="list-style-type: none"> ↑ P
(Galvão et al., 2009)	MPU / PSREM	96 h	<ul style="list-style-type: none"> Concentrações plasmáticas de ACTH Concentrações plasmáticas de CORT Imunorreatividade para CRH Imunorreatividade para orexina 	<ul style="list-style-type: none"> ↑ ↑ ↑ ↑
(Tartar et al., 2009)	Locomoção forçada na esteira / PTS	24 h	<ul style="list-style-type: none"> Concentrações plasmáticas de CORT Comportamento no campo aberto 	<ul style="list-style-type: none"> ↑ ↓
(Martins et al., 2010)	SPM / PSREM	96 h	<ul style="list-style-type: none"> Peso corporal Concentrações de CORT Concentrações de Insulina Níveis de RNAm para NPY 	<ul style="list-style-type: none"> ↓ ↑ ↓ ↑
(Leenaars et al., 2011)	Aparato de privação de sono contendo uma barra de varredura no assoalho	12 h	<ul style="list-style-type: none"> Concentrações de CORT no CPF Atividade motora Comportamento operante para obtenção de alimento 	<ul style="list-style-type: none"> ↑ = ↓ p

Abreviações utilizadas: ACTH: hormônio adrenocorticotrófico, CORT: corticosterona, CRH: hormônio liberador de corticotrofina, LCE: labirinto em cruz elevado, CTL: controle, LC: *locus coeruleus*, PL: plataforma larga, LTP: *long-term potentiation* ou potenciação de longo prazo, MMPM: método modificado das plataformas múltiplas, NA: noradrenalina, CA: teste do campo-aberto, R1: 1º dia de recuperação de sono, PSREM: privação de sono REM, MPU: método da plataforma única, TNF: fator de necrose tumoral, PTS: privação total de sono.

A partir dos trabalhos elencados acima, podemos concluir que períodos de privação de sono superiores a 12 h ativam os sistemas de resposta ao estresse. Por extrapolação, seria possível supor, então, que todas as consequências da privação prolongada de sono seriam mediadas pelos hormônios do estresse, CORT e/ou CRH e/ou NA. Porém, numerosas evidências indicam que as consequências da PSREM sobre diversas funções são mediadas por interações mais complexas do que somente pelo aumento da liberação desses hormônios. A seguir apresentarei três comportamentos que são modificados pela PSREM ou pela restrição de SREM, com os quais vimos trabalhando e que também estão sujeitos à influência de estressores.

5.3.1. Privação de sono e memória emocional

A memória não é um fenômeno singular, e em seres humanos pode ser classificada, quanto ao tipo, em memória declarativa (memória de fatos, que pode ser acessada conscientemente, sendo subdividida em memória episódica e semântica) e memória não-declarativa (memória implícita, de hábitos ou habilidades). Além disso, existem estágios para a formação da memória que incluem a aquisição, consolidação e evocação (Walker, 2008). Em roedores, entretanto, não é possível classificar a memória em declarativa e não-declarativa devido à dificuldade de observar o quanto a informação é evocada conscientemente. Mas é possível classificar a memória em dependente de HPC, uma vez que a lesão dessa estrutura pode prejudicar alguns tipos de tarefa, como condicionamento de medo ao contexto (Maren and Fanselow, 1997), labirinto aquático de Morris (Eijkenboom and Van Der Staay, 1999) e esQUIVA inibitória (Best and Orr, 1973), e independente de HPC, como o condicionamento de medo ao som, cujo prejuízo ocorre após lesão ou inativação da AMI (Phillips and LeDoux, 1992) e do estriado dorsal (Ferreira et al., 2003; Ferreira et al., 2008).

Entre as inúmeras funções atribuídas ao sono, uma que ganhou destaque há algumas décadas é a de facilitar a consolidação da memória, com grande ênfase para a influência do SREM (Smith, 1995; Walker and Stickgold, 2004). A relação entre SREM e processos mnemônicos está fundamentada em duas linhas principais de evidências. A primeira mostra que aprendizagem de novas tarefas produz aumento de SREM (De Koninck et al., 1989; Mandai et al., 1989; Smith and Lapp, 1991; Smith et al., 2004) e que aumento do tempo de SREM melhora a consolidação da memória (Walker and Stickgold, 2004). Recentemente um trabalho muito elegante reforçou a importância do SREM para a

consolidação da memória. Nesse estudo foram investigados os efeitos do aumento de SREM na consolidação e evocação de memória espacial por meio de injeção de carbacol (agonista colinérgico) na formação reticular da ponte ou de infusão i.c.v. de CLIP, um peptídeo derivado do ACTH indutor de SREM (ver mais adiante neste capítulo) ou da PSREM pelo método da plataforma, aplicados após o treino de uma tarefa de labirinto em Y com discriminação do braço iluminado. No treino os animais aprendiam a evitar o braço não-iluminado (naturalmente preferido) pela associação com o choque nas patas de 1 mA. O teste foi realizado 24 h após o treino e todos os procedimentos que produziram aumento do SREM aumentaram a consolidação da tarefa, produzindo melhora de desempenho dos animais durante o teste (Wetzel et al., 2003).

O segundo conjunto de evidências está pautado na demonstração de que a privação de sono, em especial do SREM, prejudica a aquisição de tarefas, tanto antes, quanto após o treinamento de aquisição das tarefas (Aleisa et al., 2011; Alhola and Polo-Kantola, 2007; Chernik, 1972; Gais et al., 2006; Gisquet-Verrier and Smith, 1989; Hagewoud et al., 2011; Hagewoud et al., 2010; Kim et al., 2005). Porém, o efeito da privação de sono pelos métodos da plataforma única ou das plataformas múltiplas sobre a memória de ratos não é consensual. Os resultados podem depender, por exemplo, das tarefas utilizadas, da duração da privação, além da espécie e da linhagem dos animais utilizados. A natureza da tarefa também pode ser um fator importante para determinar se a privação de sono prejudica o desempenho de animais em testes de aprendizagem. Animais privados de sono por 96 h exibem incontestável prejuízo no desempenho em tarefas dependentes do hipocampo, como labirinto aquático de Morris (Smith and Rose, 1996), esQUIVA inibitória (Bueno et al., 1994; Dubiela et al., 2010; Esumi et al., 2011; Moreira et al., 2003) e CMC (Dametto et al., 2002; Pinho et al., 2013; Tiba et al., 2008a), mas não no CMS (Bueno et al., 1994; Ruskin et al., 2004). Em vários dos estudos citados o treino dos animais nas tarefas ocorreu imediatamente após a PSREM; entretanto, sabemos que essa manipulação afeta o processo de atenção dos ratos (Godoi et al., 2005), o que sugere a possibilidade de que os animais podem não ter aprendido a tarefa.

Para avaliar os efeitos da PSREM na consolidação e/ou evocação da memória emocional de medo (manuscrito em preparação, Figuras 5.4 a 5.7), treinamos grupos de ratos nas tarefas de CMC ou CMS e após os treinos os animais foram submetidos à PSREM por 96 h e testados em vários momentos, como exposto a seguir:

Procedimentos comportamentais

- CMC O treino foi realizado em uma sessão na qual cada animal foi colocado individualmente na caixa de condicionamento e, após 2 min, recebeu cinco choques nas patas (0,7 mA/1 s), com intervalo de 30 s entre eles. Um minuto após o último choque, o animal foi retirado do aparelho e colocado no tanque de PSREM (grupo experimental, privação em grupo no MMPM) ou retornou à gaiola-moradia (grupo CTL). No dia do teste, o animal foi recolocado na mesma caixa de condicionamento por 5 min, sem que fosse apresentado o choque nas patas, e o tempo de congelamento foi novamente registrado, minuto a minuto.
- CMS: O treino foi realizado como no CMC, adicionando-se um estímulo sonoro a cada choque (60 dB/5 s), sendo que no último segundo o animal recebia um choque nas patas (0,7 mA), terminando concomitantemente com o som. No dia do teste, o animal foi colocado na câmara de teste, que é um ambiente diferente do treino, onde permaneceu por 5 min. O som foi apresentado com as mesmas características do dia de treino, mas sem o choque. O tempo de congelamento foi novamente registrado, minuto a minuto.

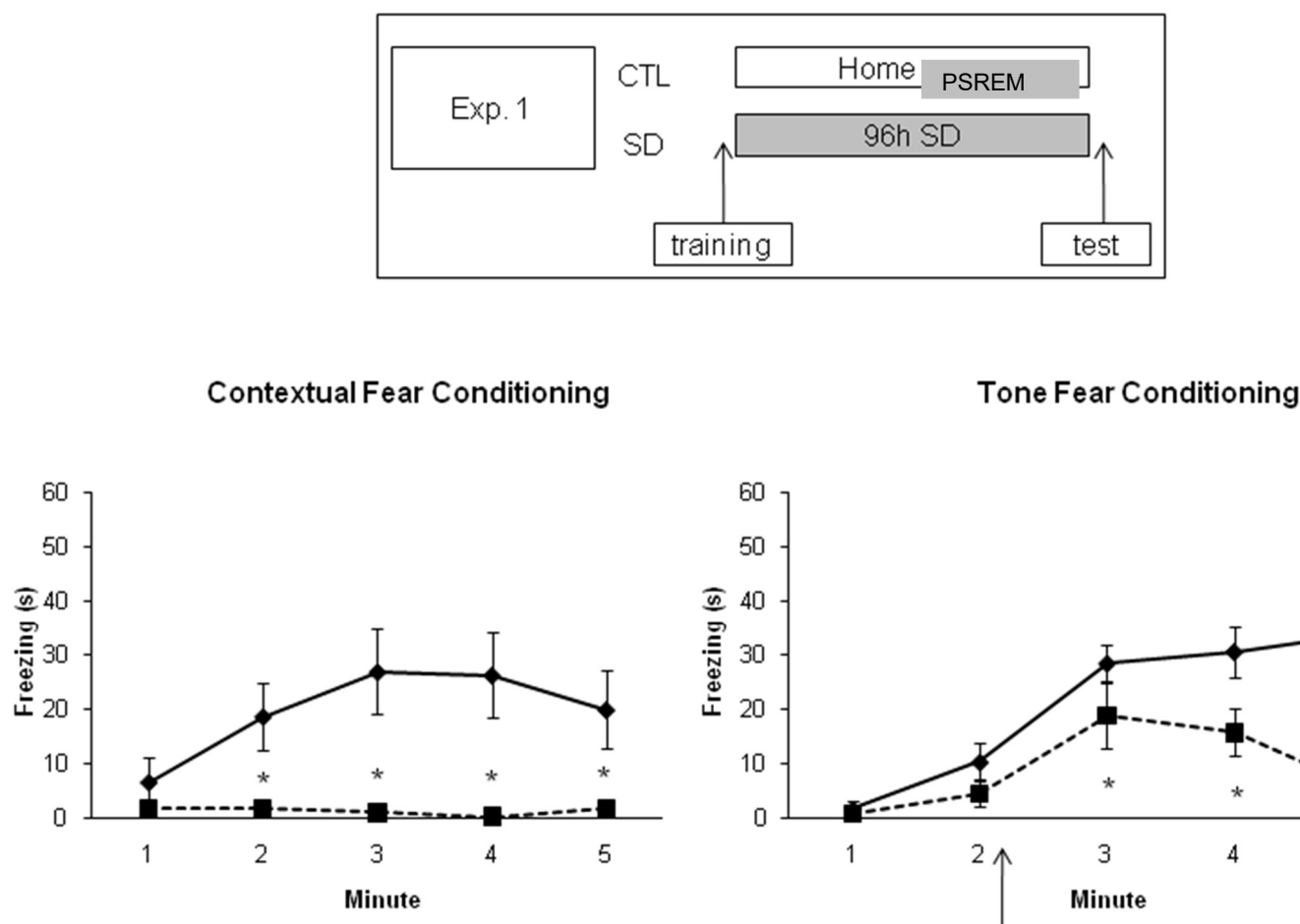


Figura 5.4 – Privação de SREM prejudica o desempenho nas tarefas de CMC e CMS. Animais foram treinados nas tarefas e o grupo CTL retornou às suas gaiolas-moradia, enquanto os animais do grupo experimental foram submetidos à PSREM por 96 h. O tempo de congelamento foi registrado a cada minuto. A seta indica o momento a partir do qual os tons foram apresentados. Valores são apresentados em média \pm erro padrão de 8 animais/grupo/tarefa.

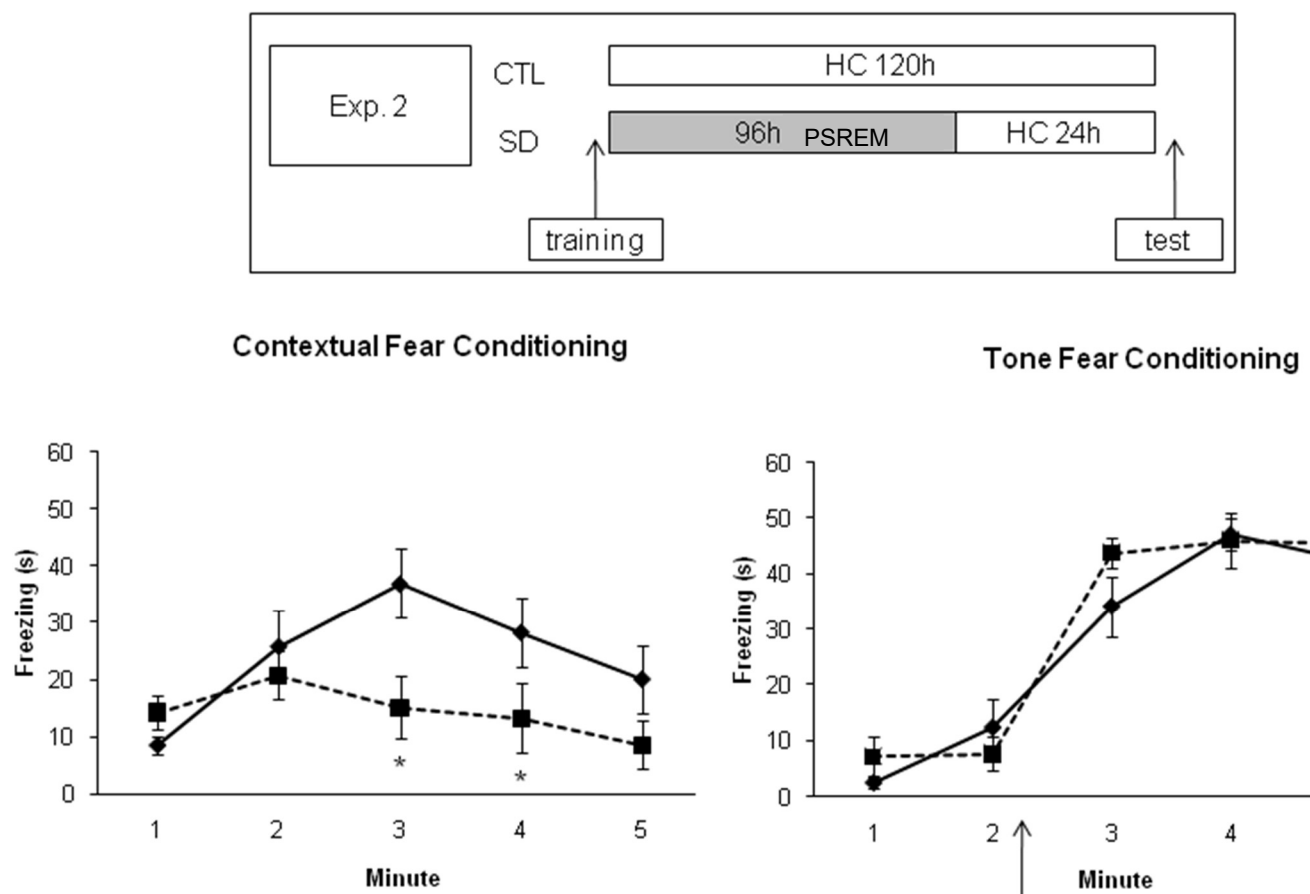


Figura 5.5 – Rebote de sono por 24 h restaura o desempenho de animais na tarefa de CMS, mas não na de CMC. Animais foram treinados nas tarefas e o grupo CTL retornou às suas gaiolas-moradia por 120 h, enquanto os animais do grupo experimental foram submetidos à PSREM por 96 h; após esse período foi-lhes permitido recuperar o sono em suas gaiolas-moradia por 24 h. O tempo de congelamento foi registrado a cada minuto. A seta indica o momento a partir do qual os tons foram apresentados. Valores são apresentados em média \pm erro padrão de 8 animais/grupo/tarefa.

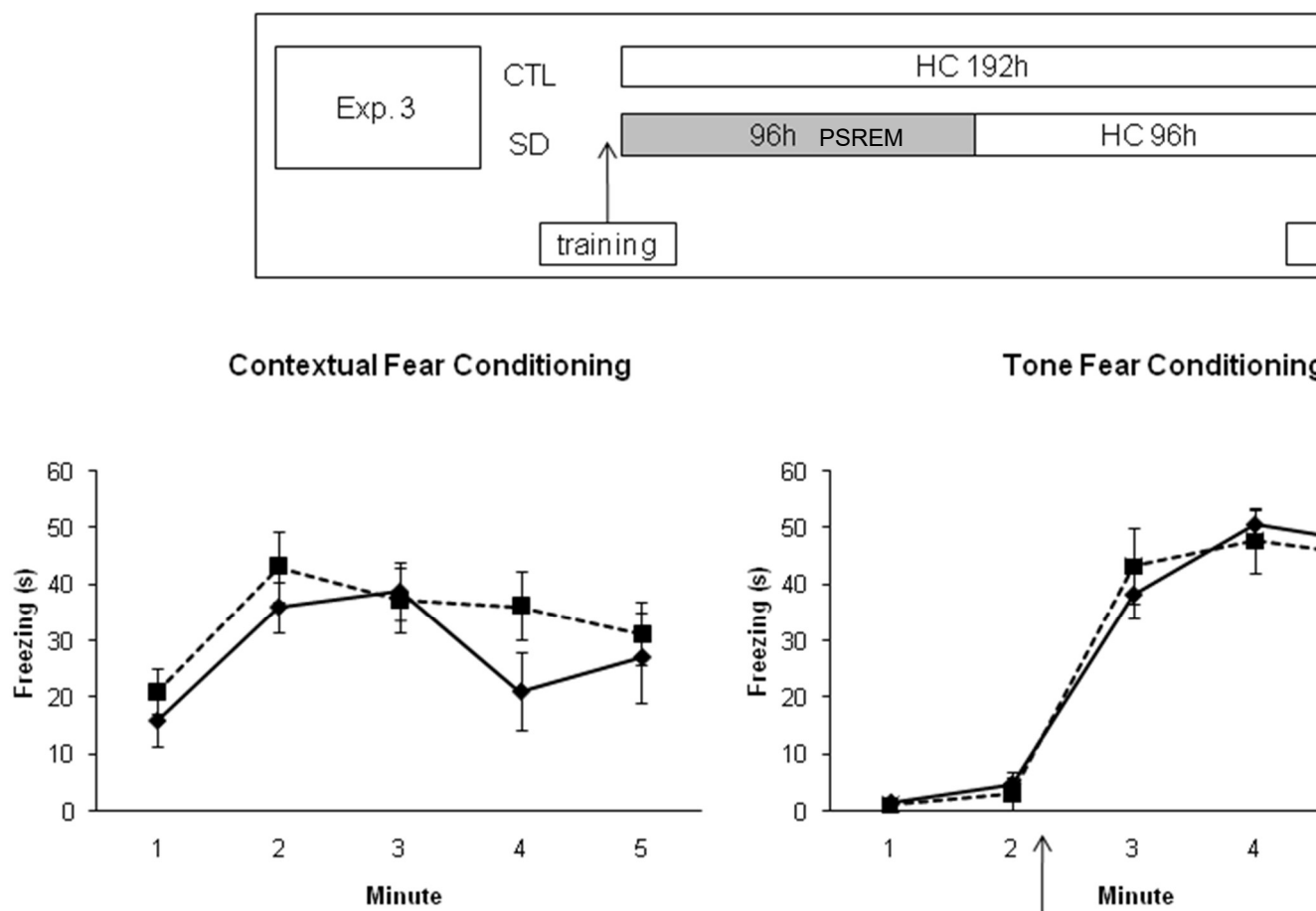


Figura 5.6 – São necessárias 96 h de recuperação de sono para restaurar a resposta de congelamento no CMC. Animais foram treinados nas tarefas e o grupo CTL retornou às suas gaiolas-moradia por 192 h, enquanto os animais do grupo experimental foram submetidos à privação de SREM por 96 h; após esse período foi-lhes permitido recuperar o sono em suas gaiolas-moradia por 96 h. O tempo de congelamento foi registrado a cada minuto. A seta indica o momento a partir do qual os tons foram apresentados. Valores são apresentados em média \pm erro padrão de 8 animais/grupo/tarefa.

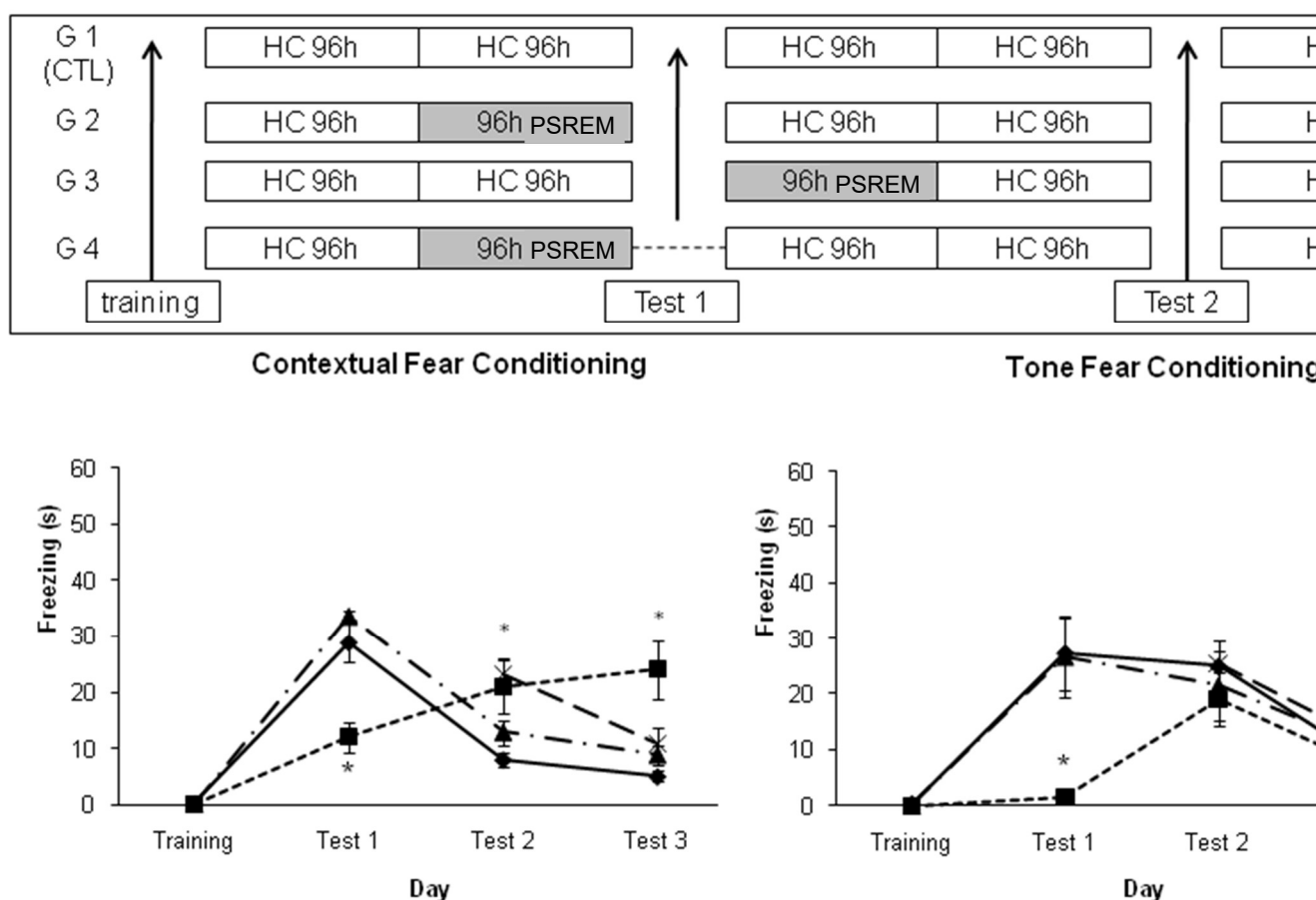


Figura 5.7 – A privação de SREM prejudica a extinção do medo na tarefa de CMC. Neste experimento todos os grupos foram treinados nas tarefas de CMC e CMS e retornaram às suas gaiolas-moradia por 96 h, para garantir que a consolidação da informação ocorresse. Neste protocolo os grupos 2 (G2) e 4 (G4) foram submetidos à privação de SREM por 96 h imediatamente antes do Teste 1, porém G4 não foi testado. G3 foi submetido à PSREM imediatamente após o Teste 1. G2 exibiu o esperado prejuízo de desempenho no Teste 1, enquanto que os outros grupos apresentaram aumento do tempo de congelamento quando testados pela primeira vez (para o G4 o primeiro teste foi o Teste 2). Nos testes subsequentes houve extinção do medo, de forma que no Teste 3, todos os grupos, exceto G2 no CMC, apresentaram tempo de congelamento reduzido.

Podemos inferir pelos resultados desse estudo que a PSREM não afetou a consolidação, mas sim, a evocação nas tarefas de medo condicionado, seja ele ao contexto ou ao som, pois observamos a restauração da evocação no CMS em um período de 24 h, enquanto que no CMC foram necessárias entre 24 h e 96 h de recuperação de sono. Além disso, esses resultados podem sugerir que o prejuízo observado imediatamente após a PSREM é devido ao aumento da secreção de CORT, já que este efeito é consistentemente observado em nossos estudos. Como discutido no Capítulo 3, existe uma faixa de concentração ótima de GCs para que ocorra consolidação da memória dependente do HPC (Pugh et al., 1997; Salehi et al., 2010). Por isso testamos essa possibilidade mantendo as concentrações de CORT em valores basais, pela administração de metirapona (MET, 100 mg/kg, via i.p.), um composto que inibe a enzima 11 β -hidroxilase, responsável pela conversão de 11-desoxicorticosterona em CORT; o composto ou a solução veículo (VEI) foram injetados a cada 12 h, durante as 96 h de privação de SREM, ou no período correspondente para os animais CTL (total de 8 administrações). Ao final desse período, todos os quatro grupos (CTL+VEI; CTL+MET; PSREM+VEI; PSREM+MET) foram treinados na tarefa de CMC e 24 h depois, foram reexpostos ao contexto e o tempo de congelamento foi registrado. A manutenção de concentrações basais de CORT (confirmada por radioimunoensaio) não reverteu o prejuízo de desempenho dos animais PSREM no CMC, demonstrando que o aumento da liberação de CORT induzida por esse protocolo não é responsável pelo prejuízo observado nessa tarefa (Tiba et al., 2008a).

Uma hipótese alternativa para explicar o prejuízo cognitivo induzido por PSREM envolve a desorganização do sono que ocorre após o término da privação. Durante as primeiras 24 h de rebote de sono observa-se um aumento substancial do tempo de SREM, em detrimento do tempo despendido em vigília e SOL; findo este período observa-se a regularização do padrão de sono (Machado et al., 2004). Sendo assim, para testar essa hipótese ratos foram privados de SREM por 96 h antes do treino da tarefa de esQUIVA inibitória por múltiplas tentativas (Moreira et al., 2010), na qual os animais são treinados até alcançarem o critério de aprendizagem, de forma, que é possível avaliar as consequências da PSREM na consolidação da memória, já que a aquisição da tarefa está garantida. Duas horas antes do início do treino, grupos diferentes de animais foram tratados com três doses de lítio e após o treino, permitimos que os animais recuperassem o sono por um período de 48 h, quando então, foram testados. Observamos que a dose de 150 mg/kg preveniu o prejuízo na consolidação da memória em animais privados de

SREM. Em grupos separados de animais, avaliamos o efeito desta dose no padrão de sono, por um período de 4 h-pós PSREM e os achados mostram que lítio reduz o tempo despendido em SREM, confirmando a hipótese de que o tempo excessivo despendido nessa fase de sono, especialmente nas primeiras horas pós-treino, pode prejudicar a consolidação da memória (Ota et al., 2013).

5.3.2. Envolvimento dos hormônios do estresse na homeostasia do sono

O sono é considerado um período de extremo anabolismo, durante o qual ocorre aumento das concentrações de hormônio do crescimento (GH), PRL e testosterona, ao passo que hormônios catabólicos, como a adrenalina e o cortisol estão inibidos (Born and Fehm, 2000). A modulação da atividade (neuro)endócrina é mais facilmente averiguada em seres humanos, pois os estágios de sono são bem definidos e suficientemente duradouros para permitir a realização de estudos de correlação entre as variáveis. Assim, achados experimentais em voluntários sadios mostram que a liberação de GH está vinculada ao SOL, quando ocorrem os picos de secreção; além disso, a privação de sono abole a secreção desse hormônio, que é restaurada em igual magnitude durante essa fase do sono, mesmo que o indivíduo durma durante o dia. Por outro lado, a liberação de CORT está vinculada ao ritmo de atividade/repouso determinado pelo relógio biológico e é apenas reduzida, mas não abolida, durante o sono diurno (van Cauter and Turek, 2001).

A inibição da secreção dos hormônios de resposta ao estresse tem o claro objetivo de favorecer o sono, uma vez que estão vinculados ao alerta. Infusão de CRH aumenta a frequência de ondas cerebrais associadas ao alerta e vigília (Ehlers et al., 1986) e a hiperatividade deste sistema, mediada pelo CRHR1, está envolvida com redução de SOL, em um modelo animal de ansiedade inata (Lancel et al., 2002). Curiosamente, o SREM é facilitado em camundongos transgênicos que super-expressam CRH no prosencéfalo e este efeito é contraposto pela administração de antagonista do CRHR1 (Kimura et al., 2010). Esses resultados podem explicar, mesmo que parcialmente, as alterações de sono descritas em pacientes deprimidos, que apresentam hiperatividade do sistema CRH (Holsboer, 1999), redução do SOL, redução da latência para SREM, aumento do tempo de SREM e fragmentação do sono (Armitage, 2007). Quanto ao cortisol, existe uma correlação inversa entre a secreção pulsátil desse hormônio e as ondas delta, características do SOL (Gronfier et al., 1997). Nesta correlação, a ausência do pulso de CORT precede, em cerca de 10 min, a ocorrência do episódio de SOL, enquanto que as variações de secreção de

CORT ocorrem independentemente das oscilações de SOL, indicando que ambos os eventos são regulados separadamente, mas quando coincidem temporalmente, as oscilações estão em fases opostas (Gronfier et al., 1998). A relação do CORT com o SREM parece seguir a mesma função em U invertido, como se observa em pacientes com Doença de Addison (caracterizada por insuficiência adrenal), que exibem sono fragmentado, aumento da latência para iniciar o SREM e redução do tempo despendido nessa fase do sono; essas alterações são corrigidas pela administração de hidrocortisona (que à semelhança do hormônio natural, apresenta afinidade por ambos MR e GR) antes de dormir (Garcia-Borreguero et al., 2000). Efeito semelhante foi observado em animais submetidos à REST por tempos diferentes: 30 min, 1 h, 2 h ou 4 h, ao final das quais foram avaliados as concentrações de CORT e o padrão de sono. Os resultados mostraram que tanto o tempo mais curto (que gerou menor concentração de CORT) quanto o mais longo (que gerou a maior concentração de CORT) resultaram em menor tempo de rebote de SREM, enquanto que os tempos intermediários produziram o rebote mais robusto dessa fase do sono. Por outro lado, a relação inversa entre os tempos de estresse e a expressão de SOL fica clara neste estudo (Marinesco et al., 1999). A representação desses resultados encontra-se na Figura 5.8.

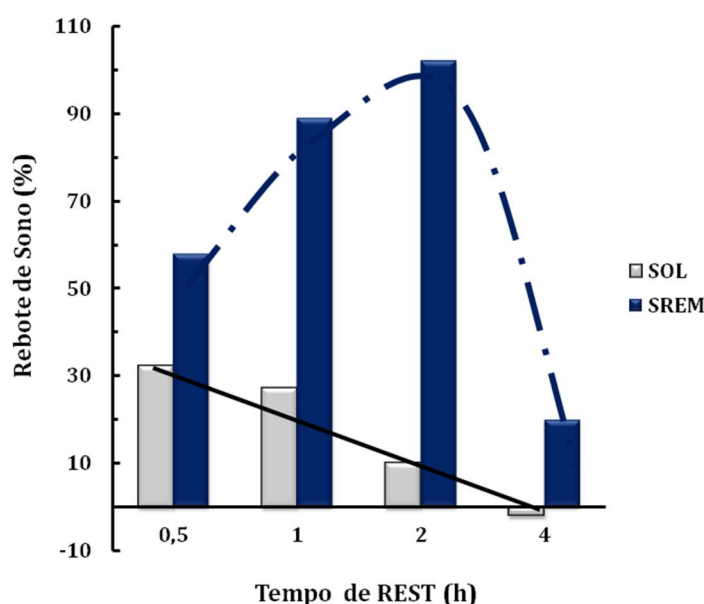


Figura 5.8 – Representação esquemática dos efeitos do estresse no rebote de SOL e SREM. Quanto mais longo é o período de estresse, maiores são as concentrações de CORT e, conseqüentemente, há mais inibição gradual do SOL. O SREM, por sua vez, é regulado por concentrações ótimas de CORT; sendo assim, o estresse de curta ou longa duração resulta em rebote menor. Adaptado de (Marinesco et al., 1999).

Com esse conhecimento em mente, buscamos examinar se o estresse e os hormônios do estresse poderiam modificar o rebote de sono produzido pela PSREM. Nossa hipótese

é que tanto o estressor crônico de choque nas patas imprevisível quanto a administração de CORT ou infusão de CRH impediriam a expressão do rebote de SREM em animais privados por 96 h. Os resultados dos estudos farmacológicos mostram que a infusão de CRH, duas vezes ao dia (7:00 h e 19:00 h), durante 96 h de PSREM inibe a expressão de rebote de SREM no primeiro dia de recuperação de sono (refletido, especialmente, pela redução da duração dos episódios) mesmo em animais muito propensos a compensar a perda dessa fase do sono (Machado et al., 2010). Resultados semelhantes foram obtidos em animais submetidos ao estresse de choque nas patas escapável, que normalmente apresentam rebote de SREM, exceto quando recebem infusão de CRH (Sanford et al., 2008). Este efeito inibitório sobre o SREM persiste mesmo em animais *knock out* para o CRHR1, embora o efeito sobre o SOL seja abolido nesses animais (Romanowski et al., 2010). Quanto à influência da CORT na homeostasia do sono, utilizamos um protocolo de administração de CORT ou de MET semelhante ao estudo com infusão de CRH, que resultou em menor rebote de sono, devido à redução do SOL e do número de episódios de SREM, no primeiro dia de recuperação de sono. Os efeitos da MET podem ser explicados pelo fato de que, ao inibir a síntese de CORT, essa substância reduz a eficiência do *feedback* negativo da CORT, acarretando o aumento da secreção de CRH (Machado et al., 2013).

Para avaliar os efeitos do estresse sobre o rebote de SREM, utilizamos um estressor que sabidamente inibe esta fase de sono, choque imprevisível e inescapável nas patas (Liu et al., 2003; Palma et al., 2000; Sanford et al., 2010; Yang et al., 2011), cujo protocolo consistiu em aplicar sessões de 40 min de estresse às 7:00 h e 19:00 h, diariamente, durante as 96 h de PSREM. Nossa hipótese é que o rebote seria inibido por esse estressor intenso. No entanto, para nossa surpresa, o resultado foi o oposto: esses animais apresentaram o maior rebote de SREM, com episódios muito longos, em torno de 7 min (quando normalmente os episódios duram de 1,5 a 2 min), comparados aos animais CTL submetidos ao estressor ou aos animais privados de SREM e não estressados. Quando avaliamos as concentrações de CORT, notamos que os animais que exibiram o maior rebote de sono foram os que secretaram concentrações intermediárias. Porém, o resultado mais interessante foi o robusto aumento das concentrações plasmáticas de PRL nesses animais (Machado et al., 2008). Em roedores a PRL é um potente indutor de SREM (Obal et al., 1989; Roky et al., 1995). Numerosas evidências sugerem que nossos resultados poderiam ser explicados pelo aumento desse hormônio. Por exemplo, estressores que induzem intensa liberação de PRL produzem aumento subsequente de

SREM (Bodosi et al., 2000) e linhagem de camundongos que exibe grande liberação de PRL em resposta ao estresse de REST também apresentam aumento do tempo despendido nessa fase do sono (Meerlo et al., 2001). Ademais, camundongos deficientes em PRL dormem menos SREM do que os animais normais e após 11 a 12 dias de tratamento por infusão de PRL, o SREM desses animais é restaurado à quantidade normal (Obál et al., 2005). Portanto realizamos outro estudo para confirmar a hipótese de que as alterações de sono observadas nos animais privados de SREM e submetidos ao estresse repetido eram devidas à PRL. Neste experimento (trabalho de Pós-Doutorado de Ricardo Borges Machado, dados não publicados), realizamos um estudo no qual avaliamos a participação da PRL no rebote de sono decorrente da associação de privação de SREM e estresse intenso e repetido. Para isso, utilizamos quatro grupos de animais: CTL-não estresse (CTL-NEst); CTL+estresse (CTL-Est; choque nas patas, aplicado de forma imprevisível e repetida ao longo da de 96 h); privação de SREM-não estresse (PSREM-NEst); privação de SREM+estresse (PSREM-Est). Ao final do procedimento os encéfalos dos animais foram avaliados para determinação de alguns parâmetros. Em um experimento adicional PRL ou líquido cefalorraquidiano artificial (veículo) foram infundidos no NDR e o sono dos animais foi avaliado por um período de 24 h, antes (basal) e após a infusão.

Os resultados, apresentados a seguir, demonstram que a PRL é um importante mediador do efeito observado no estudo de Machado e colaboradores (Machado et al., 2008) e o NDR é um sítio de ação primordial para a indução de SREM.

1) Imunorreatividade para PRL (PRL-ir) na área hipotalâmica lateral (AHL)/área perifornical

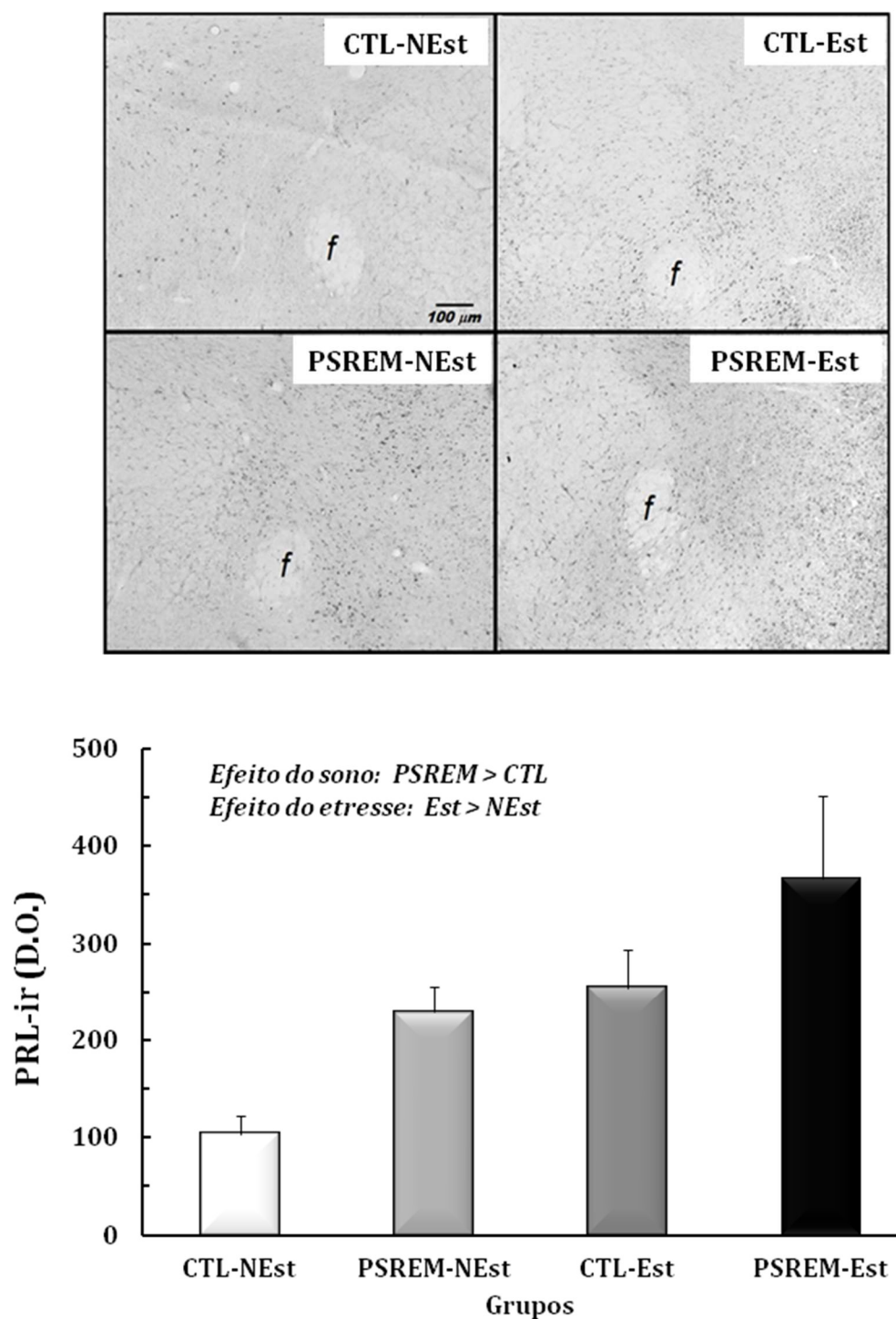


Figura 5.9 – Privação de SREM associada ao estressor repetido produz maior aumento de PRL-ir na AHL/área perifornical. Ratos controle (CTL) ou submetidos à privação de SREM (PSREM) foram expostos ao estresse de choque imprevisível nas patas (sessões de 40 min), a cada 12 h durante as 96 h de privação de sono (Est) ou mantido nos ambientes sem estresse (NEst). Os valores são apresentados como média \pm erro padrão de 7-8 animais/grupo.

2) Determinação das concentrações de PRL na AHL

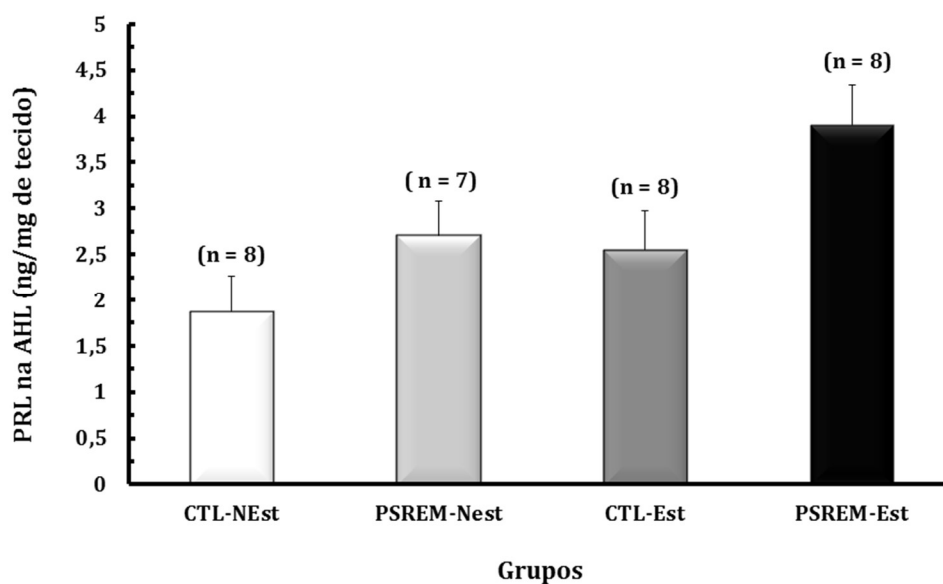


Figura 5.10 - A privação de SREM associada ao estressor repetido produz o maior aumento das concentrações de PRL na AHL. Ratos controle (CTL) ou submetidos à privação de SREM (PSREM) foram expostos ao estresse de choque imprevisível nas patas (sessões de 40 min), a cada 12 h durante as 96 h de privação de sono (Est) ou mantido nos ambientes sem estresse (NEst). Os valores são apresentados como média \pm erro padrão de 7-8 animais/grupo.

3) Indução de SREM pela infusão de PRL no NDR

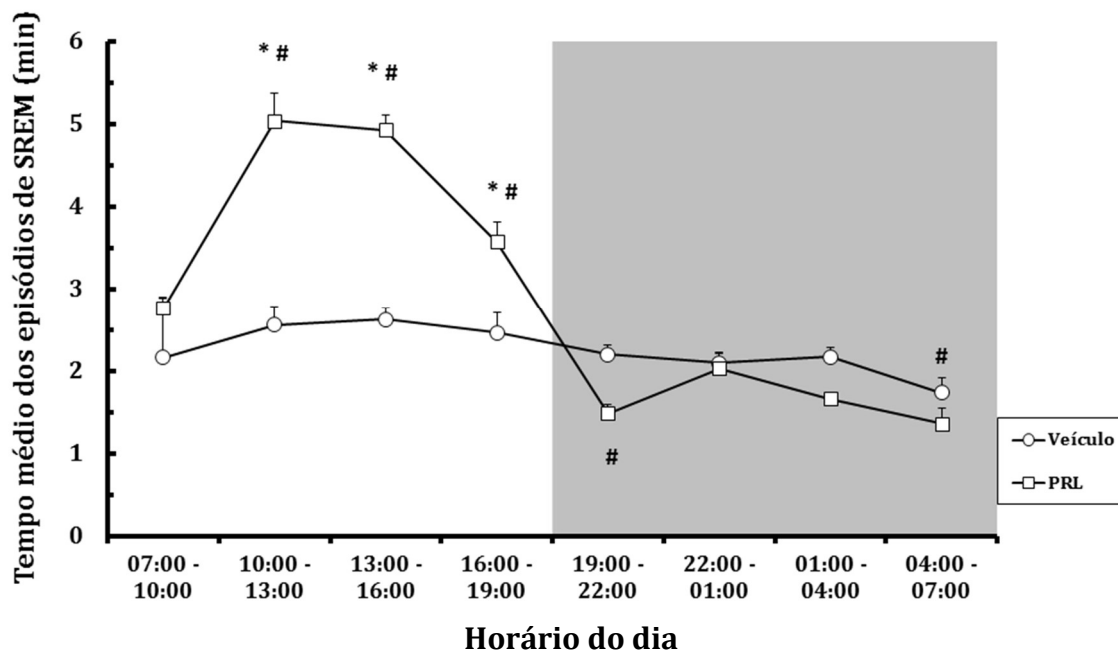


Figura 11 - Infusão de PRL no NDR produz prolongamento da duração dos episódios de SREM. Animais foram submetidos à implantação de eletrodos para o registro de sono e cânula para a infusão de PRL (1 ng, em volume de 0,3 μ L em fluxo de 0,05 μ L/min) ou de líquido cefalorraquidiano artificial (veículo). O tempo médio de duração dos episódios de SREM foi calculado pela divisão do tempo total despendido em SREM pelo número de episódios, em blocos de 3 h, durante 24 h de registro de sono. Os valores são expressos como média \pm erro padrão de 5-7 animais/grupo. * - Diferente do grupo veículo; # - Diferente do bloco 7:00 - 10:00 h.

5.3.3. Efeitos da privação ou da restrição de sono no metabolismo energético

O aumento alarmante dos índices de obesidade nos Estados Unidos (Leproult and Van Cauter, 2010) tem mobilizado diversos setores da área da saúde na tentativa de determinar quais fatores ambientais seriam responsáveis por esse fenômeno. Evidências epidemiológicas indicam que a redução do tempo de sono é um fator de risco para obesidade e desenvolvimento da síndrome metabólica, caracterizada por diabetes do tipo 2 e doenças cardiovasculares (Hanlon and Van Cauter, 2011; Penev, 2012). A ingestão alimentar e o sono são controlados por diversos mecanismos regulatórios, incluindo fatores metabólicos, autonômicos, endócrinos e ambientais, todos eles, integrados pelo hipotálamo (Adamantidis and de Lecea, 2008). Indivíduos que dormem pouco, seja por pressões de trabalho e sociais, seja por características pessoais (curto-dormidores), tendem a apresentar aumento da massa corporal aliado ao aumento de ingestão calórica. Vários estudos mostram a relação da redução de horas de sono com o desenvolvimento de diabetes do tipo 2 em trabalhadores por turno (Violanti et al., 2009), curto-dormidores (Knutson et al., 2006; Yaggi et al., 2006) e em indivíduos com a síndrome da apneia do sono (Marshall et al., 2009). Entretanto, uma avaliação crítica dos trabalhos publicados a esse respeito apresenta inconsistências sobre a previsão alarmista de que alterações do tempo de sono sejam responsáveis pelo aumento de obesidade (Marshall et al., 2008).

Estudos com voluntários saudáveis mostram que mesmo após apenas uma noite de restrição do tempo de sono para 4 h ocorre aumento de 22% na ingestão calórica (Brondel et al., 2010), provavelmente devido à desregulação do balanço de liberação de peptídeos orexigênicos e anorexigênicos (Knutson et al., 2007; Marshall et al., 2008). Esta suposição é corroborada por relatos de que voluntários submetidos a 24 h de privação de sono apresentam aumento do apetite, especialmente por alimentos calóricos, como doces e salgadinhos ricos em amido (Spiegel et al., 2004), aumento da fome e das concentrações plasmáticas de GHrelina após 7 h de privação de sono (Schmid et al., 2008). A secreção da GHrelina aumenta durante o jejum e diminui 1 h após o consumo de alimentos. Durante a vigília, as concentrações plasmáticas de leptina e GHrelina encontram-se em contraposição, porém, durante o sono, ambos os hormônios estão aumentados e a GHrelina diminui aproximadamente 2 h antes do despertar voltando a se elevar no horário da primeira refeição, sugerindo que esteja envolvida com a busca por alimento (Cummings et al., 2001). Em voluntários saudáveis submetidos à uma noite de privação de sono, ocorre redução das concentrações de GHrelina em comparação com uma noite

de sono normal (Dzaja et al., 2004). Em pacientes insones ocorre um fenômeno parecido, com redução das concentrações de GHrelina ao longo da noite, além de redução de estágio 2 do SOL e de SREM (Motivala et al., 2009). Por outro lado, pacientes apnêicos apresentam aumento das concentrações de leptina e de NPY, sendo a primeira apenas em pacientes obesos e o segundo em todos os pacientes, sugerindo a possibilidade de ocorrência de síndrome de resistência à leptina, dependente da qualidade do sono. A normalização desses mediadores ocorre com o tratamento com aparelho de pressão positiva nas vias aéreas superiores, por mais de 4 h por noite (Barceló et al., 2005). Embora os mecanismos periféricos responsáveis pela associação entre privação ou restrição de sono, obesidade e síndrome metabólica em seres humanos estejam bem determinados, a regulação central desse fenômeno só pode ser explorada em modelos animais (Hanlon and Van Cauter, 2011).

Há décadas, os estudos em animais demonstram que a privação de sono resulta em alterações metabólicas, como hiperfagia e perda de peso corporal, independentemente do método utilizado (Barf et al., 2012a; Everson and Crowley, 2004; Galvão et al., 2009; Koban et al., 2006; Koban et al., 2008; Kushida et al., 1989; Suchecki et al., 2003; Suchecki and Tufik, 2000), refletindo aumento da taxa metabólica e do gasto energético (Hipolide et al., 2006; Koban and Swinson, 2005). Estudos conduzidos em nosso Departamento revelam que 96 h de PSREM ativam os núcleos hipotalâmicos que regulam a ingestão alimentar com aumento de RNAm para orexina (ORX) e NPY, ambos neuropeptídeos orexígenos (Martins et al., 2010) e da imunorreatividade para (ORX-ir) na AHL (Galvão et al., 2009). Alguns resultados sugerem que o aumento do consumo alimentar possa não ser real, pois durante a PSREM os ratos apresentam mais comportamento de roer que resulta em grande desperdício de ração, perdida na água dos recipientes de privação (Martins et al., 2006; Martins et al., 2008). Entretanto, a análise do consumo alimentar nas fases clara e escura do ritmo diurno revela que, em comparação com o grupo CTL, o aumento de consumo alimentar durante a vigência da privação de sono ocorre durante a fase clara, que corresponde ao período de repouso dos animais, e à partir do terceiro dia de privação (Galvão et al., 2009). Koban e colaboradores estudaram os efeitos metabólicos de 20 dias de PSREM e observaram que a hiperfagia se inicia após o quinto dia de privação e que ao final do período experimental, ocorre aumento da expressão de NPY no NArq, que foi correlacionado tanto com a redução de massa corporal quanto com o aumento do consumo energético (Koban et al., 2008).

A perda de peso corporal parece estar associada ao aumento da secreção de CORT, pois animais tratados com MET, durante a PSREM não exibem a perda de peso comumente observada (Tiba et al., 2008a). Esta redução acentuada da massa corporal induzida por PSREM é evidenciada pela perda de tecido adiposo (Hipolide et al., 2006), que resulta, consequentemente, em menores concentrações de leptina (Koban and Swinson, 2005; Rosa Neto et al., 2010). Este hormônio é determinante para o mecanismo de saciedade, por modular a expressão de neuropeptídeos envolvidos no controle da ingestão calórica e do metabolismo (Klok et al., 2007). Por um lado, a administração de leptina ou seu aumento espontâneo reduz as concentrações hipotalâmicas de RNAm para NPY no NArq de camundongos obesos da linhagem ob/ob e aumenta o RNAm para CRH no NPV, ocasionando assim, a redução de ingestão alimentar e, consequentemente, do peso corporal (Schwartz et al., 1996). Por outro lado, a redução de leptina e de glicose aumentam a expressão de RNAm para ORX, favorecendo o aumento de consumo alimentar (Cai et al., 1999).

Apesar de os estudos de privação de sono em animais terem revelado importantes mecanismos centrais do controle da fome e saciedade, a restrição de sono pode ser um modelo mais apropriado para modelar condições crônicas de sono inadequado, por se aproximar mais da realidade humana. Alguns métodos de restrição de sono já foram validados em ratos. Utilizando o método do tambor giratório, Barf e colaboradores (Barf et al., 2012a) submeteram ratos à restrição de sono (20 h no tambor, a uma velocidade de um ciclo por min/4 h de sono na gaiola moradia) durante cinco dias, alternados com dois dias de descanso na gaiola-moradia. Esse protocolo foi repetido por um período de quatro semanas, ao final das quais observaram redução das concentrações plasmáticas de insulina e leptina, e aumento das concentrações de CORT. Os autores mostraram, ainda que os animais submetidos a esse protocolo apresentaram aumento de peso mais acentuado durante os dias de descanso do que os animais do grupo CTL, sem que houvesse diferença no consumo alimentar, sugerindo que fisiologicamente, esses animais compensam o gasto energético quando estão em suas gaiola. Estes autores também mostraram que após um período de 14 dias de restrição de sono por esse método, os animais desenvolveram resistência à insulina; porém, o grupo CTL para locomoção forçada, sem restrição de sono, também apresentou a mesma alteração, indicando que este efeito seja devido ao estresse inerente a ambas as situações e não propriamente à restrição de sono (Barf et al., 2010).

Em nosso laboratório utilizamos a restrição de sono pelo método da plataforma única, em que os animais permanecem nessa condição por 18 h e retornam às gaiolas-moradia por 6 h, quando podem dormir livremente. A janela de sono coincide com o horário de ocorrência da maior expressão de SREM, produzindo alterações homeostáticas no sono. Durante o período de restrição de sono, os animais apresentam fragmentação do sono e inibição do SREM (Machado et al., 2005), em um padrão semelhante ao que se observa na síndrome da apneia do sono. Utilizando esse protocolo, recentemente mostrou-se que ao final de 21 dias de restrição de sono, os animais não exibem hiperfagia e não ocorre aumento da expressão do gene de NPY, embora ocorra elevação da expressão de pré-pró-orexina e redução da expressão de POMC, um neuropeptídeo anorexígeno (Martins et al., 2010). Portanto, parece que a restrição de sono prolongada também pode desencadear alterações de comportamento alimentar, porém, não é um fator determinante isolado para o desenvolvimento de síndrome metabólica, pelo menos no modelo animal. Uma importante diferença entre a realidade do ser humano e os modelos de privação e restrição de sono em animais diz respeito à qualidade dos alimentos disponíveis. Como descrito acima, voluntários submetidos à restrição de sono em condições controladas relatam aumento de volição por alimentos calóricos, como carboidratos e lipídeos (Brondel et al., 2010; Spiegel et al., 2004), enquanto que em nossos experimentos, os animais têm livre acesso à ração balanceada. Portanto procuramos examinar se a oferta de alimentos calóricos durante a restrição de sono poderia ser um fator importante para a elaboração de um modelo de síndrome metabólica em ratos (trabalho de Pós-Doutorado de Daniel Paulino Venâncio, dados não publicados). Para tanto, ratos foram distribuídos em dois grupos principais: CTL e submetidos à restrição de sono por 21 dias (RS21). Em cada um destes grupos, os animais receberam dieta padrão (DP), dieta hiperglicídica, enriquecida com sacarose (DHG) ou dieta hiperlipídica, enriquecida com banha de porco (DHL). Ao longo do protocolo os pesos corporais, bem como o consumo real das dietas (descontada a perda de ração na água), foram registrados diariamente. Ao final dos 21 dias, os animais foram eutanasiados e amostras de sangue, tecido adiposo retroperitoneal e o hipotálamo foram coletados para a avaliação de parâmetros envolvidos em mecanismos periféricos e centrais de regulação do metabolismo energético.

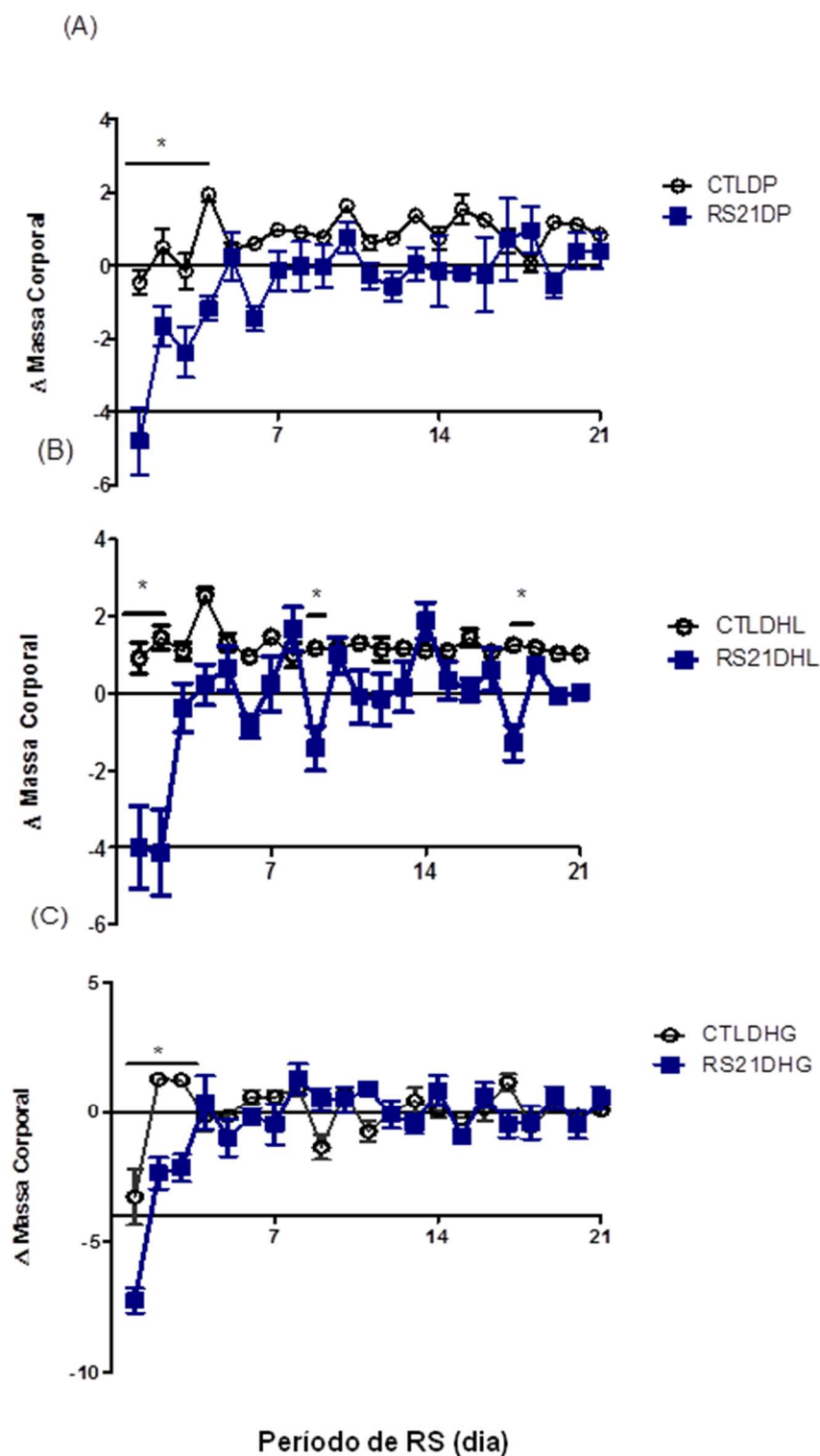


Figura 5.12 - Efeito da restrição de sono por 21 dias (RS21) sobre a variação da massa corporal em animais que consumiram diferentes tipos de dieta. (A) animais que consumiram dieta padrão (DP), (B) animais que consumiram dieta hiperlipídica (DHL) e (C) animais que consumiram dieta hiperglicídica (DHG). * Diferente do respectivo grupo CTL; $p < 0,001$. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão de 10 animais/grupo/dieta.

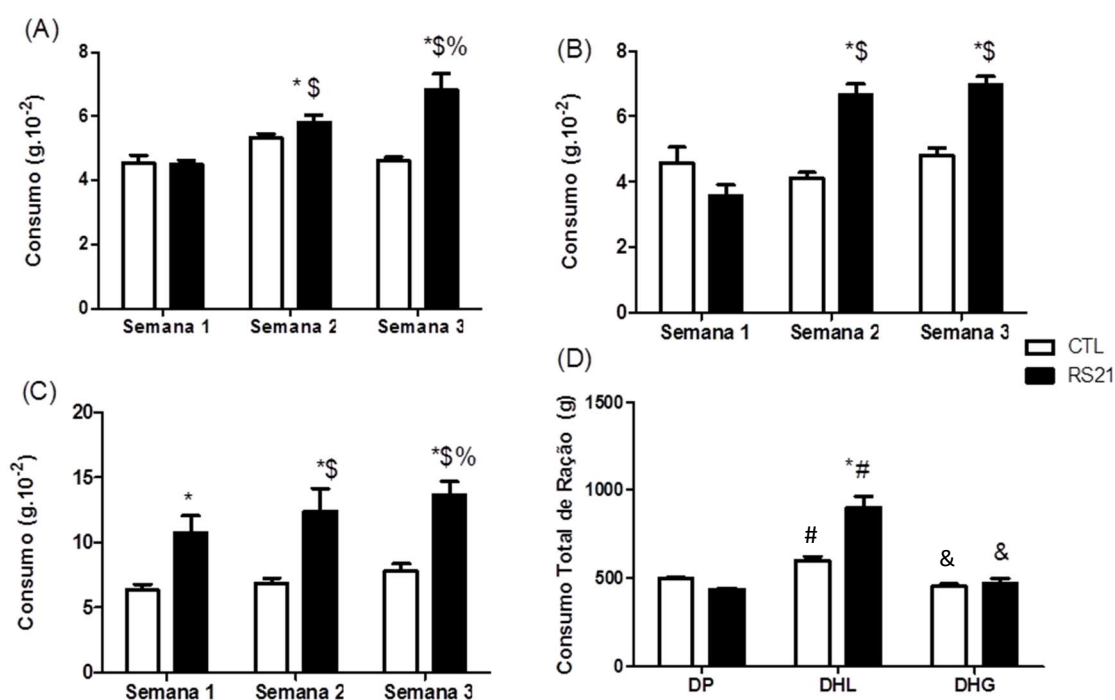


Figura 5.13 - Efeito da restrição de sono sobre o consumo de ração relativo a 100 g de massa corporal e o consumo total de ração. (A) Animais que consumiram dieta padrão (DP), (B) animais que consumiram dieta hiperglicídica (DHG), (C) animais que consumiram dieta hiperlipídica (DHL) e (D) o consumo total de ração. Animais controle (CTL) e submetidos à restrição de sono por 21 dias (RS21) foram alimentados com dieta padrão (CTL+DP; RS21+DP), dieta hiperlipídica (CTL+DHL; RS21+DHL) ou dieta hiperglicídica (CTL+DHG; RS21+DHG). O consumo de ração foi monitorado ao longo dos 21 dias de restrição de sono. * $p < 0,05$ em relação ao grupo CTL; # $p < 0,05$ em relação aos animais do mesmo grupo que consumiram DP; & $p < 0,05$ em relação aos animais do mesmo grupo que consumiram DHL; \$ $p < 0,05$ em relação aos animais do mesmo grupo, na semana 1 e % $p < 0,05$ em relação aos animais do mesmo grupo, na semana 2. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão de 10 animais/grupo/dieta.

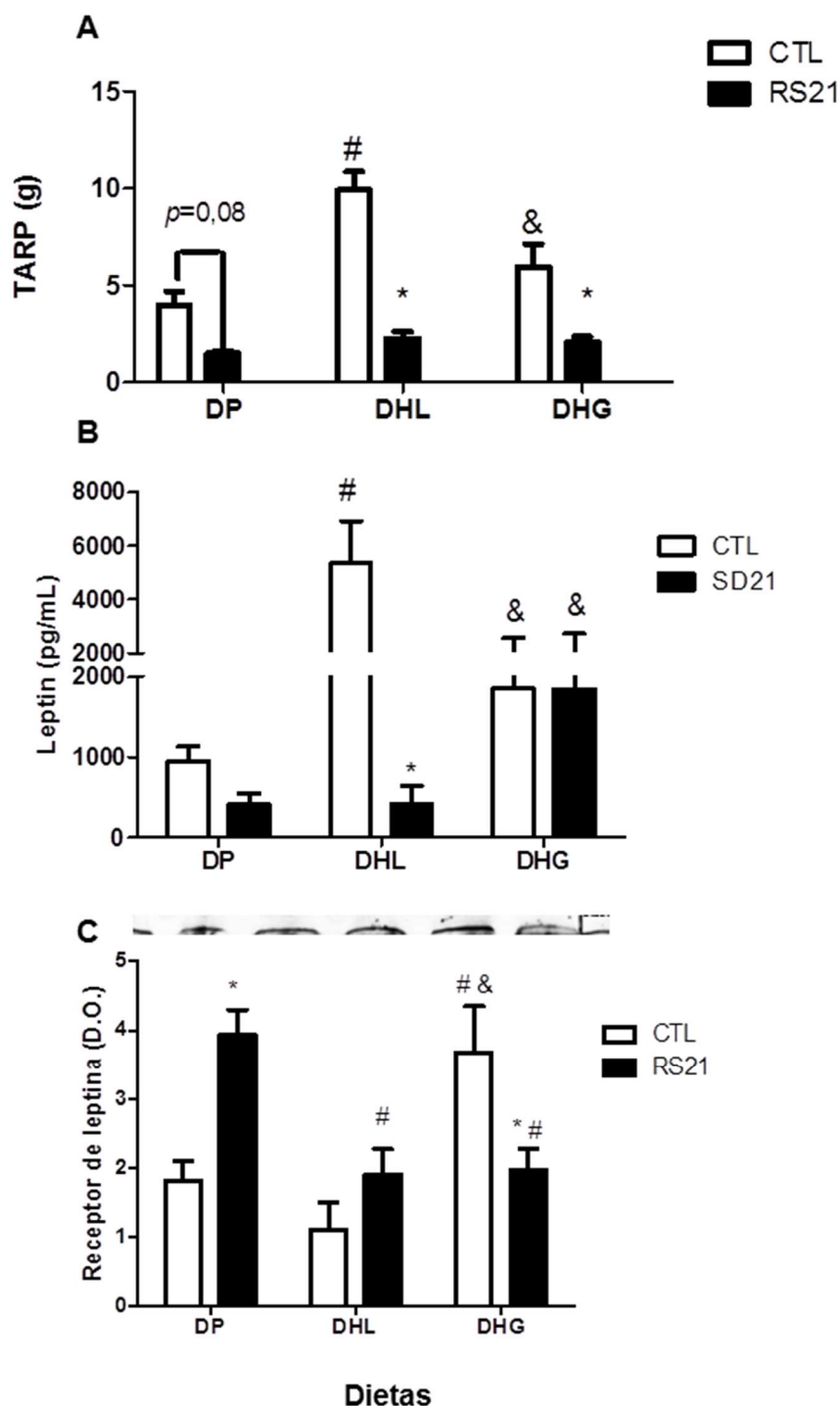


Figura 5.14 – (A) Efeito da restrição de sono sobre a massa de tecido adiposo retroperitoneal (TARP) (g); (B) Efeito da restrição de sono sobre as concentrações plasmáticas de Leptina (pg/mL); (C) Efeito da restrição de sono sobre a expressão do receptor de Leptina no hipotálamo. Animais controle (CTL) e submetidos à restrição de sono por 21 dias (RS21) foram alimentados com dieta padrão (DP), dieta hiperlipídica (DHL) ou dieta hiperglicídica (DHG). As amostras foram obtidas imediatamente após o período de RS21. Os animais CTL foram mantidos em suas gaiolas-moradias com as respectivas dietas. * $p < 0,05$ em relação ao respectivo grupo CTL; # $p < 0,05$ em relação ao grupo que consumiu DP; & $p < 0,05$ em relação ao grupo que consumiu DHL. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão de 6 animais/grupo/dieta, em (A) e (B) e 4 animais/grupo/dieta em (C).

Os resultados deste estudo replicaram a perda de peso observada em outros trabalhos (Barf et al., 2012a; Barf et al., 2012b) e neste caso, a redução ocorreu com maior intensidade nos primeiros dias do protocolo de restrição de sono, independente da dieta ofertada aos animais. Aparentemente, a dieta hiperglicídica tenha compensado a perda de peso de maneira mais eficiente do que a hiperlipídica, pois com essa dieta não se observa diferença entre os grupos a partir do 4º dia de protocolo. Paradoxalmente, os animais apresentaram um elevado consumo de ração durante o período de restrição de sono, em especial aqueles que receberam as dietas hipercalóricas, que consumiram mais ração desde a primeira semana do período experimental, sendo que os animais que receberam DHL foram os que apresentaram maior consumo relativo e total de ração.

Ainda não é possível afirmarmos que nosso modelo de restrição de sono por 21 dias seja um estímulo estressor, pois no trabalho de Martins e colaboradores (Martins et al., 2010) não foram encontradas diferenças nas concentrações de CORT entre o grupo experimental e o grupo CTL. Porém, outro estudo revela que oito dias de restrição de sono, pelo método do tambor giratório, produzem aumento na secreção de CORT (Barf et al., 2012b). Essa controvérsia pode ser devida a dois fatores, o tempo de sono permitido aos animais (4 h nos estudos com o tambor e 6 h em nossos estudos) e ao tempo de duração do protocolo, pois o mais longo pode permitir habituação. De qualquer forma, em machos, diferentes modalidades de estressores crônicos resultam em redução do ganho de peso corporal e do consumo alimentar (Lenglos et al., 2013; Macedo et al., 2012; Martí et al., 1994; Ricart-Jané et al., 2002; Tamashiro et al., 2007; Tamashiro et al., 2006). Aparentemente, o único estressor capaz de manter ou aumentar o consumo alimentar e reduzir o peso corporal é o frio, por um mecanismo que envolve aumento da termogênese (Akana et al., 1999; Bell et al., 2002; Gomez and Dallman, 2001; Luz et al., 2003). Além disso, o aumento precoce do consumo de dietas hipercalóricas em animais submetidos à restrição de SREM está de acordo com a hipótese de que dietas palatáveis podem atenuar a atividade do eixo HPA em situações de estresse (Dallman et al., 2004; Dallman et al., 2003; Pecoraro et al., 2004). Humanos que são constantemente submetidos a situações de débito de sono, preferem ingerir refeições mais calóricas e palatáveis. Isto, por vezes, é referido como a principal causa do aumento do peso corporal e da massa de gordura nesses indivíduos (Nishiura et al., 2010).

Quanto aos mecanismos de controle do comportamento alimentar, os grupos alimentados com dieta padrão ou dieta hiperlipídica exibiram um padrão compensatório

entre as concentrações plasmáticas de leptina e a expressão do receptor para leptina no hipotálamo. Ou seja, a restrição de SREM não modificou essa regulação. Entretanto, a dieta hiperglicídica gerou desregulação desses parâmetros, uma vez que as concentrações plasmáticas de leptina em animais submetidos à restrição de sono foram iguais às dos animais CTL, porém, a expressão dos receptores de leptina no hipotálamo foi menor em animais experimentais. Esses resultados demonstram que a restrição de sono por 21 dias produz alterações nos mecanismos centrais de regulação do balanço energético. Entretanto, nossa hipótese de que dietas hipercalóricas pudessem desencadear obesidade nos animais submetidos à restrição de sono não foi confirmada. Esses achados reforçam a suposição que tanto a privação quanto a restrição de sono representam situações de tamanho débito energético que mesmo a oferta de dietas hipercalóricas é incapaz de alterar o ganho de peso desses animais.

Com base nos achados de nossos estudos sobre PSREM é possível propor que esta situação representa uma nova modalidade de estresse, caracterizada pela falta de controle (não há nada que o animal possa fazer para escapar dessa situação) e por ativação dos sistemas de resposta ao estresse. Embora ocorra relativa habituação à situação, ao final de 96 h de privação de SREM, as concentrações de ACTH e CORT dos animais experimentais ainda são maiores do que as dos animais CTL (Galvão et al., 2009). Portanto, o mais provável é que PSREM seja um estressor complexo, que envolve aspectos físicos e cognitivos, cuja neurobiologia ainda carece de esclarecimentos.

6. Considerações finais e Perspectivas futuras

O estresse faz parte do cotidiano humano. Porém, é importante que não seja visto apenas como algo negativo e prejudicial, pois muitas vezes a classificação negativa depende mais de quem o percebe do que do estímulo propriamente dito. Situações estressantes nos mantêm alertas e com a atenção voltada para o estímulo, mobiliza estoques energéticos e elicia comportamentos cujo objetivo é nos capacitar a enfrentá-las da forma mais bem-sucedida possível. As respostas hormonal e comportamental de estresse são modificadas pela história prévia do indivíduo, uma vez que comportamentos adequados ou estratégias de enfrentamento bem-sucedidas são consolidados em nossa memória e essas informações são recrutadas para garantir o sucesso em enfrentá-las, caso essas situações se repitam no futuro, e a sobrevivência.

Grandes esforços vêm sendo realizados para determinar os fatores de risco que tornam os indivíduos vulneráveis às doenças induzidas por estresse ou traumas. No entanto, me parece que é hora de olharmos para os fatores que tornam os indivíduos resilientes a esses estímulos e os auxiliam a enfrentar as adversidades de maneira saudável. Talvez essa seja a ferramenta que ainda falta para possibilitar novas propostas de tratamentos e terapêuticas mais efetivos para tratar as doenças relacionadas ao estresse que tanto afligem os seres humanos.

Referências

- Abel MS, Villegas F, Abreu J, Gimino F, Steiner S, Beer B, Meyerson LR. 1983. The effect of rapid eye movement sleep deprivation on cortical beta-adrenergic receptors. *Brain Res Bull* 11(6):729-34.
- Adamantidis A, de Lecea L. 2008. Sleep and metabolism: shared circuits, new connections. *Trends Endocrinol Metab* 19(10):362-70.
- Agid O, Shapira B, Zislin J, Ritsner M, Hanin B, Murad H, Troudart T, Bloch M, Heresco-Levy U, Lerer B. 1999. Environment and vulnerability to major psychiatric illness: a case control study of early parental loss in major depression, bipolar disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry* 4(2):163-72.
- Akana SF, Strack AM, Hanson ES, Horsley CJ, Milligan ED, Bhatnagar S, Dallman MF. 1999. Interactions among chronic cold, corticosterone and puberty on energy intake and deposition. *Stress* 3(2):131-46.
- Alciati A, Gesuele F, Casazza G, Foschi D. 2013. The relationship between childhood parental loss and metabolic syndrome in obese subjects. *Stress Health* 29(1):5-13.
- Aldrich M, Eiser A, Lee M, Shipley JE. 1989. Effects of continuous positive airway pressure on phasic events of REM sleep in patients with obstructive sleep apnea. *Sleep* 12(5):413-9.
- Aleisa AM, Alzoubi KH, Alkadhi KA. 2011. Post-learning REM sleep deprivation impairs long-term memory: reversal by acute nicotine treatment. *Neurosci Lett* 499(1):28-31.
- Alhola P, Polo-Kantola P. 2007. Sleep deprivation: Impact on cognitive performance. *Neuropsychiatr Dis Treat* 3(5):553-67.
- Andersen ML, Bignotto M, Machado RB, Tufik S. 2004. Different stress modalities result in distinct steroid hormone responses by male rats. *Braz J Med Biol Res* 37(6):791-7.
- Andersen ML, Hoshino K. 2008. Estrutura do sono em ratos. In: Tufik S, editor. *Medicina e Biologia do Sono*. São Paulo: Editora Manole Ltda. p 59-70.
- Andersen ML, Martins PJ, D'Almeida V, Bignotto M, Tufik S. 2005. Endocrinological and catecholaminergic alterations during sleep deprivation and recovery in male rats. *J Sleep Res* 14(1):83-90.
- Andersen SL, Teicher MH. 1999. Serotonin laterality in amygdala predicts performance in the elevated plus maze in rats. *Neuroreport* 10(17):3497-500.
- Andersen SL, Teicher MH. 2008. Stress, sensitive periods and maturational events in adolescent depression. *Trends Neurosci* 31(4):183-91.
- Andrade TG, Macedo CE, Zangrossi H, Graeff FG. 2004. Anxiolytic-like effects of median raphe nucleus lesion in the elevated T-maze. *Behav Brain Res* 153(1):55-60.
- Antoniazzi AS, Dell'Aglio DD, Bandeira RS. 1998. O conceito de *coping*: uma revisão teórica. *Estudos de Psicologia* 3(2):273-294.
- Armitage R. 2007. Sleep and circadian rhythms in mood disorders. *Acta Psychiatr Scand Suppl*(433):104-15.
- Arriza JL, Simerly RB, Swanson LW, Evans RM. 1988. The neuronal mineralocorticoid receptor as a mediator of glucocorticoid response. *Neuron* 1(9):887-900.
- Aston-Jones G, Ennis M, Pieribone VA, Nickell WT, Shipley MT. 1986. The brain nucleus locus coeruleus: restricted afferent control of a broad efferent network. *Science* 234(4777):734-7.
- Augustine GJ. 2001. How does calcium trigger neurotransmitter release? *Curr Opin Neurobiol* 11(3):320-6.
- Avishai-Eliner S, Eghbal-Ahmadi M, Tabachnik E, Brunson KL, Baram TZ. 2001. Down-regulation of hypothalamic corticotropin-releasing hormone messenger

- ribonucleic acid (mRNA) precedes early-life experience-induced changes in hippocampal glucocorticoid receptor mRNA. *Endocrinology* 142(1):89-97.
- Baldwin HA, Rassnick S, Rivier J, Koob GF, Britton KT. 1991. CRF antagonist reverses the "anxiogenic" response to ethanol withdrawal in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 103(2):227-32.
- Ballard RA, Ballard PL, Granberg JP, Sniderman S. 1979. Prenatal administration of betamethasone for prevention of respiratory distress syndrome. *J Pediatr* 94(1):97-101.
- Bangasser DA, Curtis A, Reyes BA, Bethea TT, Parastatidis I, Ischiropoulos H, Van Bockstaele EJ, Valentino RJ. 2010. Sex differences in corticotropin-releasing factor receptor signaling and trafficking: potential role in female vulnerability to stress-related psychopathology. *Mol Psychiatry* 15(9):877, 896-904.
- Barbosa Neto JB, Tiba PA, Faturi CB, de Castro-Neto EF, Naffah-Mazacoratti MdG, Maria JdJ, de Mello MF, Suchecki D. 2012. Stress during development alters anxiety-like behavior and hippocampal neurotransmission in male and female rats. *Neuropharmacology* 62(1):518-526.
- Barceló A, Barbé F, Llompарт E, de la Peña M, Durán-Cantolla J, Ladaria A, Bosch M, Guerra L, Agustí AG. 2005. Neuropeptide Y and leptin in patients with obstructive sleep apnea syndrome: role of obesity. *Am J Respir Crit Care Med* 171(2):183-7.
- Barf RP, Desprez T, Meerlo P, Scheurink AJ. 2012a. Increased food intake and changes in metabolic hormones in response to chronic sleep restriction alternated with short periods of sleep allowance. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 302(1):R112-7.
- Barf RP, Meerlo P, Scheurink AJ. 2010. Chronic sleep disturbance impairs glucose homeostasis in rats. *Int J Endocrinol* 2010:819414.
- Barf RP, Van Dijk G, Scheurink AJ, Hoffmann K, Novati A, Hulshof HJ, Fuchs E, Meerlo P. 2012b. Metabolic consequences of chronic sleep restriction in rats: Changes in body weight regulation and energy expenditure. *Physiol Behav* 107(3):322-8.
- Bartolomucci A, Palanza P, Sacerdote P, Ceresini G, Chirieleison A, Panerai AE, Parmigiani S. 2003. Individual housing induces altered immuno-endocrine responses to psychological stress in male mice. *Psychoneuroendocrinology* 28(4):540-58.
- Bell ME, Bhargava A, Soriano L, Laugero K, Akana SF, Dallman MF. 2002. Sucrose intake and corticosterone interact with cold to modulate ingestive behaviour, energy balance, autonomic outflow and neuroendocrine responses during chronic stress. *J Neuroendocrinol* 14(4):330-42.
- Bell RW, Nitschke W, Bell NJ, Zachman TA. 1974. Early experience, ultrasonic vocalizations, and maternal responsiveness in rats. *Dev Psychobiol* 7(3):235-42.
- Benedict C, Kern W, Schmid SM, Schultes B, Born J, Hallschmid M. 2009. Early morning rise in hypothalamic-pituitary-adrenal activity: a role for maintaining the brain's energy balance. *Psychoneuroendocrinology* 34(3):455-62.
- Bentivoglio M, Grassi-Zucconi G. 1997. The pioneering experimental studies on sleep deprivation. *Sleep* 20(7):570-6.
- Bergmann BM, Everson CA, Kushida CA, Fang VS, Leitch CA, Schoeller DA, Refetoff S, Rechtschaffen A. 1989. Sleep deprivation in the rat: V. Energy use and mediation. *Sleep* 12(1):31-41.
- Best PJ, Orr J. 1973. Effects of hippocampal lesions on passive avoidance and taste aversion conditioning. *Physiol Behav* 10(2):193-6.

- Bittencourt L, Suchecki D, Tufik S, Peres C, Togeiro S, Bagnato M, Nery L. 2001. The variability of the apnoea-hypopnoea index. *Journal of Sleep Research* 10(3):245-251.
- Bland RC. 1997. Epidemiology of affective disorders: a review. *Can J Psychiatry* 42(4):367-77.
- Bodosi B, Obál F, Gardi J, Komlódi J, Fang J, Krueger JM. 2000. An ether stressor increases REM sleep in rats: possible role of prolactin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279(5):R1590-8.
- Born J, DeKloet ER, Wenz H, Kern W, Fehm HL. 1991. Gluco- and antimineralocorticoid effects on human sleep: a role of central corticosteroid receptors. *Am J Physiol* 260(2 Pt 1):E183-8.
- Born J, Fehm HL. 2000. The neuroendocrine recovery function of sleep. *Noise Health* 2(7):25-38.
- Born J, Hansen K, Marshall L, Molle M, Fehm HL. 1999. Timing the end of nocturnal sleep. *Nature* 397(6714):29-30.
- Bornstein SR, Webster EL, Torpy DJ, Richman SJ, Mitsiades N, Igel M, Lewis DB, Rice KC, Joost HG, Tsokos M and others. 1998. Chronic effects of a nonpeptide corticotropin-releasing hormone type I receptor antagonist on pituitary-adrenal function, body weight, and metabolic regulation. *Endocrinology* 139(4):1546-55.
- Borsonelo EC, Suchecki D, Calil HM, Galduroz JCF. 2011a. Supplementation with fish oil and coconut fat prevents prenatal stress-induced changes in early postnatal development. *International Journal of Developmental Neuroscience* 29(5):521-527.
- Borsonelo EC, Suchecki D, Fernandes Galduroz JC. 2011b. Effect of fish oil and coconut fat supplementation on depressive-type behavior and corticosterone levels of prenatally stressed male rats. *Brain Research* 1385:144-150.
- Boudouresque F, Guillaume V, Grino M, Strbak V, Chautard T, Conte-Devolx B, Oliver C. 1988. Maturation of the pituitary-adrenal function in rat fetuses. *Neuroendocrinology* 48(4):417-22.
- Boyce WT, Chesterman E. 1990. Life events, social support, and cardiovascular reactivity in adolescence. *J Dev Behav Pediatr* 11(3):105-11.
- Boyd AL, Salleh A, Humber B, Yee J, Tomes L, Kerr LR. 2010. Neonatal experiences differentially influence mammary gland morphology, estrogen receptor α protein levels, and carcinogenesis in BALB/c mice. *Cancer Prev Res (Phila)* 3(11):1398-408.
- Bradbury MJ, Akana SF, Dallman MF. 1994. Roles of type I and II corticosteroid receptors in regulation of basal activity in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis during the diurnal trough and the peak: evidence for a nonadditive effect of combined receptor occupation. *Endocrinology* 134(3):1286-96.
- Bremne JD, Vermetten E. 2001. Stress and development: behavioral and biological consequences. *Dev Psychopathol* 13(3):473-89.
- Breuner CW, Orchinik M. 2002. Plasma binding proteins as mediators of corticosteroid action in vertebrates. *J Endocrinol* 175(1):99-112.
- Brillante R, Cossa G, Liu PY, Laks L. 2012. Rapid eye movement and slow-wave sleep rebound after one night of continuous positive airway pressure for obstructive sleep apnoea. *Respirology* 17(3):547-53.
- Britton DR, Koob GF, Rivier J, Vale W. 1982. Intraventricular corticotropin-releasing factor enhances behavioral effects of novelty. *Life Sci* 31(4):363-7.

- Britton KT, Lee G, Vale W, Rivier J, Koob GF. 1986. Corticotropin releasing factor (CRF) receptor antagonist blocks activating and 'anxiogenic' actions of CRF in the rat. *Brain Res* 369(1-2):303-6.
- Brock JW, Farooqui SM, Ross KD, Payne S, Prasad C. 1994. Stress-related behavior and central norepinephrine concentrations in the REM sleep-deprived rat. *Physiol Behav* 55(6):997-1003.
- Brown AS, van Os J, Driessens C, Hoek HW, Susser ES. 2000. Further evidence of relation between prenatal famine and major affective disorder. *Am J Psychiatry* 157(2):190-5.
- Buckley DI, Ramachandran J. 1981. Characterization of corticotropin receptors on adrenocortical cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(12):7431-5.
- Buckley TM, Schatzberg AF. 2005. On the interactions of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and sleep: normal HPA axis activity and circadian rhythm, exemplary sleep disorders. *J Clin Endocrinol Metab* 90(5):3106-14.
- Bueno OF, Lobo LL, Oliveira MG, Gugliano EB, Pomarico AC, Tufik S. 1994. Dissociated paradoxical sleep deprivation effects on inhibitory avoidance and conditioned fear. *Physiol Behav* 56(4):775-9.
- Cabib S, Campus P, Colelli V. 2012. Learning to cope with stress: psychobiological mechanisms of stress resilience. *Rev Neurosci* 23(5-6):659-72.
- Cai XJ, Widdowson PS, Harrold J, Wilson S, Buckingham RE, Arch JR, Tadayyon M, Clapham JC, Wilding J, Williams G. 1999. Hypothalamic orexin expression: modulation by blood glucose and feeding. *Diabetes* 48(11):2132-7.
- Calatayud F, Belzung C, Aubert A. 2004. Ethological validation and the assessment of anxiety-like behaviours: methodological comparison of classical analyses and structural approaches. *Behav Processes* 67(2):195-206.
- Caldji C, Francis D, Sharma S, Plotsky PM, Meaney MJ. 2000. The effects of early rearing environment on the development of GABAA and central benzodiazepine receptor levels and novelty-induced fearfulness in the rat. *Neuropsychopharmacology* 22(3):219-29.
- Caldji C, Tannenbaum B, Sharma S, Francis D, Plotsky PM, Meaney MJ. 1998. Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(9):5335-40.
- Campbell IG, Guinan MJ, Horowitz JM. 2002. Sleep deprivation impairs long-term potentiation in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 88(2):1073-6.
- Carli M, Prontera C, Samanin R. 1989. Evidence that central 5-hydroxytryptaminergic neurones are involved in the anxiolytic activity of buspirone. *Br J Pharmacol* 96(4):829-36.
- Carneiro G, Togeiro SM, Hayashi LF, Ribeiro-Filho FF, Ribeiro AB, Tufik S, Zanella MT. 2008. Effect of continuous positive airway pressure therapy on hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and 24-h blood pressure profile in obese men with obstructive sleep apnea syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295(2):E380-4.
- Carskadon MA, Dement WC. 2011. Normal human sleep: an overview. In: Kryger MH, Roth T, Dement WC, editors. *Principles and practice of sleep medicine*. 5th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders. p 16-26.
- Carvalhoes-Neto N, Ramos LR, Suchecki D, Tufik S, Huayllas MK, Kater CE. 2003. The effect of hospitalization on the sleep pattern and on cortisol secretion of healthy elderly. *Exp Aging Res* 29(4):425-36.

- Cassilhas RC, Lee KS, Fernandes J, Oliveira MG, Tufik S, Meeusen R, de Mello MT. 2012. Spatial memory is improved by aerobic and resistance exercise through divergent molecular mechanisms. *Neuroscience* 202:309-17.
- Catallani B, Palma BD, Gil FZ, Suchecki D. 2008. Brief and long maternal separations in a lupus-prone strain: Dissociation decrease corticosterone secretion from disease-related parameters. *Brain Behavior and Immunity* 22(3):367-374.
- Challis JR, Sloboda D, Matthews SG, Holloway A, Alfaidy N, Patel FA, Whittle W, Fraser M, Moss TJ, Newnham J. 2001. The fetal placental hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, parturition and post natal health. *Mol Cell Endocrinol* 185(1-2):135-44.
- Champagne DL, Bagot RC, van Hasselt F, Ramakers G, Meaney MJ, de Kloet ER, Joëls M, Krugers H. 2008. Maternal care and hippocampal plasticity: evidence for experience-dependent structural plasticity, altered synaptic functioning, and differential responsiveness to glucocorticoids and stress. *J Neurosci* 28(23):6037-45.
- Chang PP, Ford DE, Mead LA, Cooper-Patrick L, Klag MJ. 1997. Insomnia in young men and subsequent depression. The Johns Hopkins Precursors Study. *Am J Epidemiol* 146(2):105-14.
- Chaoulloff F, Durand M, Mormède P. 1997. Anxiety- and activity-related effects of diazepam and chlordiazepoxide in the rat light/dark and dark/light tests. *Behav Brain Res* 85(1):27-35.
- Chatelain A, Boudouresque F, Chautard T, Dupouy JP, Oliver C. 1988. Corticotrophin-releasing factor immunoreactivity in the hypothalamus of the rat during the perinatal period. *J Endocrinol* 119(1):59-64.
- Chatelain A, Dupouy JP, Allaume P. 1980. Fetal-maternal adrenocorticotropin and corticosterone relationships in the rat: effects of maternal adrenalectomy. *Endocrinology* 106(4):1297-303.
- Chatelain A, Naaman E, Durand P, Lepretre A, Dupouy JP. 1990. Development of adenylate cyclase activity in rat adrenal glands during the perinatal period. *J Endocrinol* 126(2):211-6.
- Chernik DA. 1972. Effect of REM sleep deprivation on learning and recall by humans. *Percept Mot Skills* 34(1):283-94.
- Chida Y, Hamer M. 2008. Chronic psychosocial factors and acute physiological responses to laboratory-induced stress in healthy populations: a quantitative review of 30 years of investigations. *Psychol Bull* 134(6):829-85.
- Choy KH, van den Buuse M. 2008. Attenuated disruption of prepulse inhibition by dopaminergic stimulation after maternal deprivation and adolescent corticosterone treatment in rats. *Eur Neuropsychopharmacol* 18(1):1-13.
- Cirelli C, Faraguna U, Tononi G. 2006. Changes in brain gene expression after long-term sleep deprivation. *J Neurochem* 98(5):1632-45.
- Cirulli F, Gottlieb SL, Rosenfeld P, Levine S. 1992. Maternal factors regulate stress responsiveness in the neonatal rat. *Psychobiology* 20:143-152.
- Coenen AM, van Luijckelaar EL. 1985. Stress induced by three procedures of deprivation of paradoxical sleep. *Physiol Behav* 35(4):501-4.
- Cohen HB, Dement WC. 1965. Sleep: changes in threshold to electroconvulsive shock in rats after deprivation of "paradoxical" phase. *Science* 150(701):1318-9.
- Cohen S, Wills TA. 1985. Stress, social support, and the buffering hypothesis. *Psychol Bull* 98(2):310-57.

- Copinschi G, Van Cauter E. 1995. Effects of ageing on modulation of hormonal secretions by sleep and circadian rhythmicity. *Horm Res* 43(1-3):20-4.
- Coplan JD, Abdallah CG, Mathew SJ, Shungu DC, Mao X, Smith EL, Kaufman D, Gorman JM, Owens MJ, Nemeroff CB and others. 2011. Metabolic syndrome and neurometabolic asymmetry of hippocampus in adult bonnet monkeys. *Physiol Behav* 103(5):535-9.
- Cottrell EC, Seckl JR. 2009. Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of adult disease. *Front Behav Neurosci* 3:19.
- Cruz FC, Quadros IM, Planeta CaS, Miczek KA. 2008. Maternal separation stress in male mice: long-term increases in alcohol intake. *Psychopharmacology (Berl)* 201(3):459-68.
- Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. 2001. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 50(8):1714-9.
- Curtis AL, Bethea T, Valentino RJ. 2006. Sexually dimorphic responses of the brain norepinephrine system to stress and corticotropin-releasing factor. *Neuropsychopharmacology* 31(3):544-54.
- Czéh B, Michaelis T, Watanabe T, Frahm J, de Biurrun G, van Kampen M, Bartolomucci A, Fuchs E. 2001. Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(22):12796-801.
- Czéh B, Müller-Keuker JI, Rygula R, Abumaria N, Hiemke C, Domenici E, Fuchs E. 2007. Chronic social stress inhibits cell proliferation in the adult medial prefrontal cortex: hemispheric asymmetry and reversal by fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology* 32(7):1490-503.
- Czéh B, Welt T, Fischer AK, Erhardt A, Schmitt W, Müller MB, Toschi N, Fuchs E, Keck ME. 2002. Chronic psychosocial stress and concomitant repetitive transcranial magnetic stimulation: effects on stress hormone levels and adult hippocampal neurogenesis. *Biol Psychiatry* 52(11):1057-65.
- D'Almeida V, Hipolide DC, Azzalis LA, Lobo LL, Junqueira VB, Tufik S. 1997. Absence of oxidative stress following paradoxical sleep deprivation in rats. *Neurosci Lett* 235(1-2):25-8.
- Dallman MF. 2003. Stress by any other name? *Horm Behav* 43(1):18-20; discussion 28-30.
- Dallman MF, Akana SF, Bhatnagar S, Bell ME, Strack AM. 2000. Bottomed out: metabolic significance of the circadian trough in glucocorticoid concentrations. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24 Suppl 2:S40-6.
- Dallman MF, Engeland WC, Rose JC, Wilkinson CW, Shinsako J, Siedenburg F. 1978. Nycthemeral rhythm in adrenal responsiveness to ACTH. *Am J Physiol* 235(5):R210-8.
- Dallman MF, la Fleur SE, Pecoraro NC, Gomez F, Houshyar H, Akana SF. 2004. Minireview: glucocorticoids--food intake, abdominal obesity, and wealthy nations in 2004. *Endocrinology* 145(6):2633-8.
- Dallman MF, Pecoraro N, Akana SF, La Fleur SE, Gomez F, Houshyar H, Bell ME, Bhatnagar S, Laugero KD, Manalo S. 2003. Chronic stress and obesity: a new view of "comfort food". *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(20):11696-701.
- Dametto M, Suchecki D, Bueno O, Moreira K, Tufik S, Oliveira M. 2002. Social stress does not interact with paradoxical sleep deprivation-induced memory impairment. *Behavioural Brain Research* 129(1-2):171-178.

- Day TA. 2005. Defining stress as a prelude to mapping its neurocircuitry: no help from allostasis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29(8):1195-200.
- Dayas CV, Buller KM, Crane JW, Xu Y, Day TA. 2001. Stressor categorization: acute physical and psychological stressors elicit distinctive recruitment patterns in the amygdala and in medullary noradrenergic cell groups. *Eur J Neurosci* 14(7):1143-52.
- de Andrade JS, Céspedes IC, Abrão RO, Dos Santos TB, Diniz L, Britto LR, Spadari-Bratfisch RC, Ortolani D, Melo-Thomas L, da Silva RC and others. 2013. Chronic unpredictable mild stress alters an anxiety-related defensive response, Fos immunoreactivity and hippocampal adult neurogenesis. *Behav Brain Res* 250:81-90.
- de Boer SF, de Beun R, Slangen JL, van der Gugten J. 1990. Dynamics of plasma catecholamine and corticosterone concentrations during reinforced and extinguished operant behavior in rats. *Physiol Behav* 47(4):691-8.
- de Kloet ER, Oitzl MS, Joels M. 1993. Functional implications of brain corticosteroid receptor diversity. *Cell Mol Neurobiol* 13(4):433-55.
- de Kloet ER, Oitzl MS, Joels M. 1999. Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? *Trends Neurosci* 22(10):422-6.
- De Koninck J, Lorrain D, Christ G, Proulx G, Coulombe D. 1989. Intensive language learning and increases in rapid eye movement sleep: evidence of a performance factor. *Int J Psychophysiol* 8(1):43-7.
- Dement W. 1960. The effect of dream deprivation. *Science* 131:1705-7.
- Dent GW, Okimoto DK, Smith MA, Levine S. 2000a. Stress-induced alterations in corticotropin-releasing hormone and vasopressin gene expression in the paraventricular nucleus during ontogeny. *Neuroendocrinology* 71(6):333-42.
- Dent GW, Smith MA, Levine S. 2000b. Rapid induction of corticotropin-releasing hormone gene transcription in the paraventricular nucleus of the developing rat. *Endocrinology* 141(5):1593-8.
- Diener C, Kuehner C, Brusniak W, Struve M, Flor H. 2009. Effects of stressor controllability on psychophysiological, cognitive and behavioural responses in patients with major depression and dysthymia. *Psychol Med* 39(1):77-86.
- Dringenberg HC, Kornelsen RA, Pacelli R, Petersen K, Vanderwolf CH. 1998. Effects of amygdaloid lesions, hippocampal lesions, and buspirone on black-white exploration and food carrying in rats. *Behav Brain Res* 96(1-2):161-72.
- Dubiela FP, Oliveira MG, Moreira KM, Nobrega JN, Tufik S, Hipólido DC. 2010. Inverse benzodiazepine agonist beta-CCM does not reverse learning deficit induced by sleep deprivation. *Neurosci Lett* 469(1):169-73.
- Dugovic C, Maccari S, Weibel L, Turek FW, Van Reeth O. 1999. High corticosterone levels in prenatally stressed rats predict persistent paradoxical sleep alterations. *J Neurosci* 19(19):8656-64.
- Duniec E, Raz M. 2011. Vitamins for the soul: John Bowlby's thesis of maternal deprivation, biomedical metaphors and the deficiency model of disease. *Hist Psychiatry* 22(85 Pt 1):93-107.
- Dupouy JP, Coffigny H, Magre S. 1975. Maternal and foetal corticosterone levels during late pregnancy in rats. *J Endocrinol* 65(3):347-52.
- Dzaja A, Dalal MA, Himmerich H, Uhr M, Pollmächer T, Schuld A. 2004. Sleep enhances nocturnal plasma ghrelin levels in healthy subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286(6):E963-7.

- Edge MD, Ramel W, Drabant EM, Kuo JR, Parker KJ, Gross JJ. 2009. For better or worse? Stress inoculation effects for implicit but not explicit anxiety. *Depress Anxiety* 26(9):831-7.
- Ehlers CL, Reed TK, Henriksen SJ. 1986. Effects of corticotropin-releasing factor and growth hormone-releasing factor on sleep and activity in rats. *Neuroendocrinology* 42(6):467-74.
- Eijkenboom M, Van Der Staay FJ. 1999. Spatial learning deficits in rats after injection of vincristine into the dorsal hippocampus. *Neuroscience* 91(4):1299-313.
- Ellenbroek BA, Cools AR. 1995. Maternal separation reduces latent inhibition in the conditioned taste aversion paradigm. *Neuroscience Research Communication* 17:27-33.
- Ellenbroek BA, Cools AR. 2000. The long-term effects of maternal deprivation depend on the genetic background. *Neuropsychopharmacology* 23(1):99-106.
- Ellenbroek BA, Cools AR. 2002. Early maternal deprivation and prepulse inhibition: the role of the postdeprivation environment. *Pharmacol Biochem Behav* 73(1):177-84.
- Ellenbroek BA, van den Kroonenberg PT, Cools AR. 1998. The effects of an early stressful life event on sensorimotor gating in adult rats. *Schizophr Res* 30(3):251-60.
- Essex MJ, Shirtcliff EA, Burk LR, Ruttle PL, Klein MH, Slattery MJ, Kalin NH, Armstrong JM. 2011. Influence of early life stress on later hypothalamic-pituitary-adrenal axis functioning and its covariation with mental health symptoms: a study of the allostatic process from childhood into adolescence. *Dev Psychopathol* 23(4):1039-58.
- Esumi LA, Palma BD, Gomes VL, Tufik S, Hipólido DC. 2011. Inflammatory markers are associated with inhibitory avoidance memory deficit induced by sleep deprivation in rats. *Behav Brain Res* 221(1):7-12.
- Evans J, Sun Y, McGregor A, Connor B. 2012. Allopregnanolone regulates neurogenesis and depressive/anxiety-like behaviour in a social isolation rodent model of chronic stress. *Neuropharmacology* 63(8):1315-26.
- Everson CA, Crowley WR. 2004. Reductions in circulating anabolic hormones induced by sustained sleep deprivation in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286(6):E1060-70.
- Everson CA, Thalacker CD, Hogg N. 2008. Phagocyte migration and cellular stress induced in liver, lung, and intestine during sleep loss and sleep recovery. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295(6):R2067-74.
- Fadda P, Fratta W. 1997. Stress-induced sleep deprivation modifies corticotropin releasing factor (CRF) levels and CRF binding in rat brain and pituitary. *Pharmacol Res* 35(5):443-6.
- Falconer EM, Galea LA. 2003. Sex differences in cell proliferation, cell death and defensive behavior following acute predator odor stress in adult rats. *Brain Res* 975(1-2):22-36.
- Faturi CB, Tiba PA, Kawakami SE, Catallani B, Kerstens M, Suchecki D. 2010. Disruptions of the mother-infant relationship and stress-related behaviours: Altered corticosterone secretion does not explain everything. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 34(6):821-834.
- Fenzl T, Romanowski CP, Flachskamm C, Honsberg K, Boll E, Hoehne A, Kimura M. 2007. Fully automated sleep deprivation in mice as a tool in sleep research. *J Neurosci Methods* 166(2):229-35.

- Ferreira AF, Real CC, Rodrigues AC, Alves AS, Britto LR. 2011. Short-term, moderate exercise is capable of inducing structural, BDNF-independent hippocampal plasticity. *Brain Res* 1425:111-22.
- Ferreira TL, Moreira KM, Ikeda DC, Bueno OF, Oliveira MG. 2003. Effects of dorsal striatum lesions in tone fear conditioning and contextual fear conditioning. *Brain Res* 987(1):17-24.
- Ferreira TL, Shammah-Lagnado SJ, Bueno OF, Moreira KM, Fornari RV, Oliveira MG. 2008. The indirect amygdala-dorsal striatum pathway mediates conditioned freezing: insights on emotional memory networks. *Neuroscience* 153(1):84-94.
- File SE, Gonzalez LE. 1996. Anxiolytic effects in the plus-maze of 5-HT_{1A}-receptor ligands in dorsal raphe and ventral hippocampus. *Pharmacol Biochem Behav* 54(1):123-8.
- Flak JN, Solomon MB, Jankord R, Krause EG, Herman JP. 2012. Identification of chronic stress-activated regions reveals a potential recruited circuit in rat brain. *Eur J Neurosci* 36(4):2547-55.
- Flinn MV, England BG. 1997. Social economics of childhood glucocorticoid stress response and health. *Am J Phys Anthropol* 102(1):33-53.
- Folkman S, Lazarus RS, Dunkel-Schetter C, DeLongis A, Gruen RJ. 1986a. Dynamics of a stressful encounter: cognitive appraisal, coping, and encounter outcomes. *J Pers Soc Psychol* 50(5):992-1003.
- Folkman S, Lazarus RS, Gruen RJ, DeLongis A. 1986b. Appraisal, coping, health status, and psychological symptoms. *J Pers Soc Psychol* 50(3):571-9.
- Frank MG, Morrisette R, Heller HC. 1998. Effects of sleep deprivation in neonatal rats. *Am J Physiol* 275(1 Pt 2):R148-57.
- Fuxe K, Wikström AC, Okret S, Agnati LF, Härfstrand A, Yu ZY, Granholm L, Zoli M, Vale W, Gustafsson JA. 1985. Mapping of glucocorticoid receptor immunoreactive neurons in the rat tel- and diencephalon using a monoclonal antibody against rat liver glucocorticoid receptor. *Endocrinology* 117(5):1803-12.
- Gais S, Born J. 2004. Declarative memory consolidation: mechanisms acting during human sleep. *Learn Mem* 11(6):679-85.
- Gais S, Lucas B, Born J. 2006. Sleep after learning aids memory recall. *Learn Mem* 13(3):259-62.
- Galvão MOL, Sinigaglia-Coimbra R, Kawakami SE, Tufik S, Suchecki D. 2009. Paradoxical sleep deprivation activates hypothalamic nuclei that regulate food intake and stress response. *Psychoneuroendocrinology* 34(8):1176-1183.
- Garcia-Borreguero D, Wehr TA, Larrosa O, Granizo JJ, Hardwick D, Chrousos GP, Friedman TC. 2000. Glucocorticoid replacement is permissive for rapid eye movement sleep and sleep consolidation in patients with adrenal insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 85(11):4201-6.
- Gibb BE, Chelminski I, Zimmerman M. 2007. Childhood emotional, physical, and sexual abuse, and diagnoses of depressive and anxiety disorders in adult psychiatric outpatients. *Depress Anxiety* 24(4):256-63.
- Giedd JN. 2004. Structural magnetic resonance imaging of the adolescent brain. *Ann N Y Acad Sci* 1021:77-85.
- Giedd JN, Blumenthal J, Jeffries NO, Castellanos FX, Liu H, Zijdenbos A, Paus T, Evans AC, Rapoport JL. 1999. Brain development during childhood and adolescence: a longitudinal MRI study. *Nat Neurosci* 2(10):861-3.
- Giedd JN, Vaituzis AC, Hamburger SD, Lange N, Rajapakse JC, Kaysen D, Vauss YC, Rapoport JL. 1996. Quantitative MRI of the temporal lobe, amygdala, and

- hippocampus in normal human development: ages 4-18 years. *J Comp Neurol* 366(2):223-30.
- Giralt M, Armario A. 1989. Individual housing does not influence the adaptation of the pituitary-adrenal axis and other physiological variables to chronic stress in adult male rats. *Physiol Behav* 45(3):477-81.
- Girardi CE, Tiba PA, Llobet GB, Levin R, Abilio VC, Suchecki D. 2013. Contextual exploration previous to an aversive event predicts long-term emotional consequences of severe stress. *Front Behav Neurosci* 7:134.
- Girotti M, Weinberg MS, Spencer RL. 2007. Differential responses of hypothalamus-pituitary-adrenal axis immediate early genes to corticosterone and circadian drive. *Endocrinology* 148(5):2542-52.
- Gisquet-Verrier P, Smith C. 1989. Avoidance performance in rat enhanced by postlearning paradoxical sleep deprivation. *Behav Neural Biol* 52(2):152-69.
- Gladwin TE, Figner B, Crone EA, Wiers RW. 2011. Addiction, adolescence, and the integration of control and motivation. *Dev Cogn Neurosci* 1(4):364-76.
- Godoi FR, Oliveira MG, Tufik S. 2005. Effects of paradoxical sleep deprivation on the performance of rats in a model of visual attention. *Behav Brain Res* 165(1):138-45.
- Gogtay N, Giedd JN, Lusk L, Hayashi KM, Greenstein D, Vaituzis AC, Nugent TF, Herman DH, Clasen LS, Toga AW and others. 2004. Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(21):8174-9.
- Goldman L, Winget C, Hollingshead GW, Levine S. 1973. Postweaning development of negative feedback in the pituitary-adrenal system of the rat. *Neuroendocrinology* 12(3):199-211.
- Gomez F, Dallman MF. 2001. Manipulation of androgens causes different energetic responses to cold in 60- and 40-day-old male rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280(1):R262-73.
- Gomez F, Houshyar H, Dallman MF. 2002. Marked regulatory shifts in gonadal, adrenal, and metabolic system responses to repeated restraint stress occur within a 3-week period in pubertal male rats. *Endocrinology* 143(8):2852-62.
- Gomez F, Manalo S, Dallman MF. 2004. Androgen-sensitive changes in regulation of restraint-induced adrenocorticotropin secretion between early and late puberty in male rats. *Endocrinology* 145(1):59-70.
- Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LA, Fuchs E. 1997. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci* 17(7):2492-8.
- Graeff FG. 1993. Role of 5-HT in defensive behavior and anxiety. *Rev Neurosci* 4(2):181-211.
- Graeff FG, Viana MB, Mora PO. 1996. Opposed regulation by dorsal raphe nucleus 5-HT pathways of two types of fear in the elevated T-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 53(1):171-7.
- Graham YP, Heim C, Goodman SH, Miller AH, Nemeroff CB. 1999. The effects of neonatal stress on brain development: implications for psychopathology. *Dev Psychopathol* 11(3):545-65.
- Greenfield EA, Lee C, Friedman EL, Springer KW. 2011. Childhood abuse as a risk factor for sleep problems in adulthood: evidence from a U.S. national study. *Ann Behav Med* 42(2):245-56.

- Grino M, Young WS, Burgunder JM. 1989. Ontogeny of expression of the corticotropin-releasing factor gene in the hypothalamic paraventricular nucleus and of the proopiomelanocortin gene in rat pituitary. *Endocrinology* 124(1):60-8.
- Groeneweg FL, Karst H, de Kloet ER, Joëls M. 2012. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at the neuronal membrane, regulators of nongenomic corticosteroid signalling. *Mol Cell Endocrinol* 350(2):299-309.
- Gronfier C, Chapotot F, Weibel L, Jouny C, Piquard F, Brandenberger G. 1998. Pulsatile cortisol secretion and EEG delta waves are controlled by two independent but synchronized generators. *Am J Physiol* 275(1 Pt 1):E94-100.
- Gronfier C, Luthringer R, Follenius M, Schaltenbrand N, Macher JP, Muzet A, Brandenberger G. 1997. Temporal relationships between pulsatile cortisol secretion and electroencephalographic activity during sleep in man. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 103(3):405-8.
- Grossman GH, Mistlberger RE, Antle MC, Ehlen JC, Glass JD. 2000. Sleep deprivation stimulates serotonin release in the suprachiasmatic nucleus. *Neuroreport* 11(9):1929-32.
- Guijarro JZ, Tiba PA, Ferreira TL, Kawakami SE, Oliveira MGM, Suchecki D. 2007. Effects of brief and long maternal separations on the HPA axis activity and the performance of rats on context and tone fear conditioning. *Behavioural Brain Research* 184(2):101-108.
- Gunnar M, Quevedo K. 2007. The neurobiology of stress and development. *Annu Rev Psychol* 58:145-73.
- Gustafsson L, Zhou Q, Nylander I. 2007. Ethanol-induced effects on opioid peptides in adult male Wistar rats are dependent on early environmental factors. *Neuroscience* 146(3):1137-49.
- Gutman DA, Nemeroff CB. 2003. Persistent central nervous system effects of an adverse early environment: clinical and preclinical studies. *Physiol Behav* 79(3):471-8.
- Guzman-Marin R, Suntsova N, Stewart DR, Gong H, Szymusiak R, McGinty D. 2003. Sleep deprivation reduces proliferation of cells in the dentate gyrus of the hippocampus in rats. *J Physiol* 549(Pt 2):563-71.
- Hagewoud R, Bultsma LJ, Barf RP, Koolhaas JM, Meerlo P. 2011. Sleep deprivation impairs contextual fear conditioning and attenuates subsequent behavioural, endocrine and neuronal responses. *J Sleep Res* 20(2):259-66.
- Hagewoud R, Whitcomb SN, Heeringa AN, Havekes R, Koolhaas JM, Meerlo P. 2010. A time for learning and a time for sleep: the effect of sleep deprivation on contextual fear conditioning at different times of the day. *Sleep* 33(10):1315-22.
- Hairston IS, Ruby NF, Brooke S, Peyron C, Denning DP, Heller HC, Sapolsky RM. 2001. Sleep deprivation elevates plasma corticosterone levels in neonatal rats. *Neurosci Lett* 315(1-2):29-32.
- Hamani C, Machado DC, Hipolide DC, Dubiela FP, Suchecki D, Macedo CE, Tescarollo F, Martins U, Covolan L, Nobrega JN. 2012. Deep Brain Stimulation Reverses Anhedonic-Like Behavior in a Chronic Model of Depression: Role of Serotonin and Brain Derived Neurotrophic Factor. *Biological Psychiatry* 71(1):30-35.
- Hanlon EC, Van Cauter E. 2011. Quantification of sleep behavior and of its impact on the cross-talk between the brain and peripheral metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 Suppl 3:15609-16.
- Hawley DF, Bardi M, Everette AM, Higgins TJ, Tu KM, Kinsley CH, Lambert KG. 2010. Neurobiological constituents of active, passive, and variable coping strategies in

- rats: integration of regional brain neuropeptide Y levels and cardiovascular responses. *Stress* 13(2):172-83.
- Hays SL, McPherson RJ, Juul SE, Wallace G, Schindler AG, Chavkin C, Gleason CA. 2012. Long-term effects of neonatal stress on adult conditioned place preference (CPP) and hippocampal neurogenesis. *Behav Brain Res* 227(1):7-11.
- Hazel NA, Hammen C, Brennan PA, Najman J. 2008. Early childhood adversity and adolescent depression: the mediating role of continued stress. *Psychol Med* 38(4):581-9.
- Heilig M. 2004. The NPY system in stress, anxiety and depression. *Neuropeptides* 38(4):213-24.
- Heim C, Nemeroff CB. 2001. The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. *Biol Psychiatry* 49(12):1023-39.
- Heim C, Newport DJ, Mletzko T, Miller AH, Nemeroff CB. 2008. The link between childhood trauma and depression: insights from HPA axis studies in humans. *Psychoneuroendocrinology* 33(6):693-710.
- Heinrichs SC, Lapsansky J, Lovenberg TW, De Souza EB, Chalmers DT. 1997. Corticotropin-releasing factor CRF1, but not CRF2, receptors mediate anxiogenic-like behavior. *Regul Pept* 71(1):15-21.
- Henning SJ. 1978. Plasma concentrations of total and free corticosterone during development in the rat. *Am J Physiol* 235(5):E451-6.
- Herman JP. 2013. Neural control of chronic stress adaptation. *Front Behav Neurosci* 7:61.
- Herman JP, Adams D, Prewitt C. 1995. Regulatory changes in neuroendocrine stress-integrative circuitry produced by a variable stress paradigm. *Neuroendocrinology* 61(2):180-90.
- Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai Y, Ostrander MM, Choi DC, Cullinan WE. 2003. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol* 24(3):151-80.
- Herrenkohl LR. 1983. Prenatal stress may alter sexual differentiation in male and female offspring. *Monogr Neural Sci* 9:176-83.
- Hillierer KM, Neumann ID, Couillard-Despres S, Aigner L, Slaterry DA. 2013. Sex-dependent regulation of hippocampal neurogenesis under basal and chronic stress conditions in rats. *Hippocampus* 23(6):476-87.
- Hipolide D, Suchecki D, Pinto A, Faria E, Tufik S. 2006. Paradoxical sleep deprivation and sleep recovery: Effects on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity, energy balance and body composition of rats. *Journal of Neuroendocrinology* 18(4):231-238.
- Hipolide DC, Tufik S, Raymond R, Nobrega JN. 1998. Heterogeneous effects of rapid eye movement sleep deprivation on binding to alpha- and beta-adrenergic receptor subtypes in rat brain. *Neuroscience* 86(3):977-87.
- Hofer MA. 1984. Early stages in the organization of cardiovascular control. *Proc Soc Exp Biol Med* 175(2):147-57.
- Hofer MA. 1987. Early social relationships: a psychobiologist's view. *Child Dev* 58(3):633-47.
- Hofer MA. 1994. Hidden regulators in attachment, separation, and loss. *Monogr Soc Res Child Dev* 59(2-3):192-207.
- Holsboer F. 1999. The rationale for corticotropin-releasing hormone receptor (CRH-R) antagonists to treat depression and anxiety. *J Psychiatr Res* 33(3):181-214.

- Hulshof HJ, Novati A, Sgoifo A, Luiten PG, den Boer JA, Meerlo P. 2011. Maternal separation decreases adult hippocampal cell proliferation and impairs cognitive performance but has little effect on stress sensitivity and anxiety in adult Wistar rats. *Behav Brain Res* 216(2):552-60.
- Huot RL, Thrivikraman KV, Meaney MJ, Plotsky PM. 2001. Development of adult ethanol preference and anxiety as a consequence of neonatal maternal separation in Long Evans rats and reversal with antidepressant treatment. *Psychopharmacology (Berl)* 158(4):366-73.
- Husum H, Termeer E, Mathé AA, Bolwig TG, Ellenbroek BA. 2002. Early maternal deprivation alters hippocampal levels of neuropeptide Y and calcitonin-gene related peptide in adult rats. *Neuropharmacology* 42(6):798-806.
- Huttunen MO, Niskanen P. 1978. Prenatal loss of father and psychiatric disorders. *Arch Gen Psychiatry* 35(4):429-31.
- Irie M, Nagata S, Endo Y, Kobayashi F. 2003. Effect of rapid eye movement sleep deprivation on allergen-induced airway responses in a rat model of asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 130(4):300-6.
- Issa FG, Sullivan CE. 1986. The immediate effects of nasal continuous positive airway pressure treatment on sleep pattern in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 63(1):10-7.
- Ivy AS, Brunson KL, Sandman C, Baram TZ. 2008. Dysfunctional nurturing behavior in rat dams with limited access to nesting material: a clinically relevant model for early-life stress. *Neuroscience* 154(3):1132-42.
- Ivy AS, Rex CS, Chen Y, Dubé C, Maras PM, Grigoriadis DE, Gall CM, Lynch G, Baram TZ. 2010. Hippocampal dysfunction and cognitive impairments provoked by chronic early-life stress involve excessive activation of CRH receptors. *J Neurosci* 30(39):13005-15.
- Jankord R, Solomon MB, Albertz J, Flak JN, Zhang R, Herman JP. 2011. Stress vulnerability during adolescent development in rats. *Endocrinology* 152(2):629-38.
- Jouvet D, Vimont E, Delorme F, Jouvet M. 1964. Étude de la privation sélective de la phase paradoxale de sommeil chez le chat. *C R Seances Soc Biol Fil* 158:756-759.
- Joëls M, de Kloet ER. 1992. Control of neuronal excitability by corticosteroid hormones. *Trends Neurosci* 15(1):25-30.
- Joëls M, de Kloet ER. 1994. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the brain. Implications for ion permeability and transmitter systems. *Prog Neurobiol* 43(1):1-36.
- Kalinichev M, Easterling KW, Holtzman SG. 2003. Long-lasting changes in morphine-induced locomotor sensitization and tolerance in Long-Evans mother rats as a result of periodic postpartum separation from the litter: a novel model of increased vulnerability to drug abuse? *Neuropsychopharmacology* 28(2):317-28.
- Kalinichev M, Easterling KW, Plotsky PM, Holtzman SG. 2002. Long-lasting changes in stress-induced corticosterone response and anxiety-like behaviors as a consequence of neonatal maternal separation in Long-Evans rats. *Pharmacol Biochem Behav* 73(1):131-40.
- Kalsbeek A, van der Spek R, Lei J, Endert E, Buijs RM, Fliers E. 2012. Circadian rhythms in the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Mol Cell Endocrinol* 349(1):20-9.
- Karatsoreos IN, McEwen BS. 2011. Psychobiological allostasis: resistance, resilience and vulnerability. *Trends Cogn Sci* 15(12):576-84.
- Kasckow JW, Baker D, Geraciotti TD. 2001. Corticotropin-releasing hormone in depression and post-traumatic stress disorder. *Peptides* 22(5):845-51.

- Kawakami SE, Quadros IM, Machado RB, Suchecki D. 2013. Sex-dependent effects of maternal separation on plasma corticosterone and brain monoamines in response to chronic ethanol administration. *Neuroscience* 253C:55-66.
- Kawakami SE, Quadros IMH, Takahashi S, Suchecki D. 2007. Long maternal separation accelerates behavioural sensitization to ethanol in female, but not in male mice. *Behavioural Brain Research* 184(2):109-116.
- Kempermann G, Gast D, Gage FH. 2002. Neuroplasticity in old age: sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. *Ann Neurol* 52(2):135-43.
- Kessler RC, Price RH, Wortman CB. 1985. Social factors in psychopathology: stress, social support, and coping processes. *Annu Rev Psychol* 36:531-72.
- Kim EY, Mahmoud GS, Grover LM. 2005. REM sleep deprivation inhibits LTP in vivo in area CA1 of rat hippocampus. *Neurosci Lett* 388(3):163-7.
- Kimura M, Müller-Preuss P, Lu A, Wiesner E, Flachskamm C, Wurst W, Holsboer F, Deussing JM. 2010. Conditional corticotropin-releasing hormone overexpression in the mouse forebrain enhances rapid eye movement sleep. *Mol Psychiatry* 15(2):154-65.
- Kirschbaum C, Kudielka BM, Gaab J, Schommer NC, Hellhammer DH. 1999. Impact of gender, menstrual cycle phase, and oral contraceptives on the activity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. *Psychosom Med* 61(2):154-62.
- Kirschbaum C, Wüst S, Hellhammer D. 1992. Consistent sex differences in cortisol responses to psychological stress. *Psychosom Med* 54(6):648-57.
- Klok MD, Jakobsdottir S, Drent ML. 2007. The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. *Obes Rev* 8(1):21-34.
- Knutson KL, Ryden AM, Mander BA, Van Cauter E. 2006. Role of sleep duration and quality in the risk and severity of type 2 diabetes mellitus. *Arch Intern Med* 166(16):1768-74.
- Knutson KL, Spiegel K, Penev P, Van Cauter E. 2007. The metabolic consequences of sleep deprivation. *Sleep Med Rev* 11(3):163-78.
- Koban M, Le WW, Hoffman GE. 2006. Changes in hypothalamic corticotropin-releasing hormone, neuropeptide Y, and proopiomelanocortin gene expression during chronic rapid eye movement sleep deprivation of rats. *Endocrinology* 147(1):421-31.
- Koban M, Sita LV, Le WW, Hoffman GE. 2008. Sleep deprivation of rats: the hyperphagic response is real. *Sleep* 31(7):927-33.
- Koban M, Swinson KL. 2005. Chronic REM-sleep deprivation of rats elevates metabolic rate and increases UCP1 gene expression in brown adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289(1):E68-74.
- Koolhaas JM, Bartolomucci A, Buwalda B, de Boer SF, Flügge G, Korte SM, Meerlo P, Murison R, Olivier B, Palanza P and others. 2011. Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. *Neurosci Biobehav Rev* 35(5):1291-301.
- Kopp C, Longordo F, Nicholson JR, Luthi A. 2006. Insufficient sleep reversibly alters bidirectional synaptic plasticity and NMDA receptor function. *J Neurosci* 26(48):12456-65.
- Krusters HJ, Oomen CA, Gumbs M, Li M, Velzing EH, Joels M, Lucassen PJ. 2012. Maternal deprivation and dendritic complexity in the basolateral amygdala. *Neuropharmacology* 62(1):534-7.
- Kudielka BM, Buske-Kirschbaum A, Hellhammer DH, Kirschbaum C. 2004a. HPA axis responses to laboratory psychosocial stress in healthy elderly adults, younger

- adults, and children: impact of age and gender. *Psychoneuroendocrinology* 29(1):83-98.
- Kudielka BM, Hellhammer DH, Wust S. 2009. Why do we respond so differently? Reviewing determinants of human salivary cortisol responses to challenge. *Psychoneuroendocrinology* 34(1):2-18.
- Kudielka BM, Kirschbaum C. 2003. Awakening cortisol responses are influenced by health status and awakening time but not by menstrual cycle phase. *Psychoneuroendocrinology* 28(1):35-47.
- Kudielka BM, Kirschbaum C. 2005. Sex differences in HPA axis responses to stress: a review. *Biol Psychol* 69(1):113-32.
- Kudielka BM, Schommer NC, Hellhammer DH, Kirschbaum C. 2004b. Acute HPA axis responses, heart rate, and mood changes to psychosocial stress (TSST) in humans at different times of day. *Psychoneuroendocrinology* 29(8):983-92.
- Kuhn CM, Butler SR, Schanberg SM. 1978. Selective depression of serum growth hormone during maternal deprivation in rat pups. *Science* 201(4360):1034-6.
- Kuipers SD, Trentani A, van der Zee EA, den Boer JA. 2013. Chronic stress-induced changes in the rat brain: Role of sex differences and effects of long-term tianeptine treatment. *Neuropharmacology* 75C:426-436.
- Kushida CA, Bergmann BM, Rechtschaffen A. 1989. Sleep deprivation in the rat: IV. Paradoxical sleep deprivation. *Sleep* 12(1):22-30.
- Laban O, Marković BM, Dimitrijević M, Janković BD. 1995. Maternal deprivation and early weaning modulate experimental allergic encephalomyelitis in the rat. *Brain Behav Immun* 9(1):9-19.
- Ladd CO, Huot RL, Thirivikraman KV, Nemeroff CB, Plotsky PM. 2004. Long-term adaptations in glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor mRNA and negative feedback on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis following neonatal maternal separation. *Biol Psychiatry* 55(4):367-75.
- Ladd CO, Thirivikraman KV, Huot RL, Plotsky PM. 2005. Differential neuroendocrine responses to chronic variable stress in adult Long Evans rats exposed to handling-maternal separation as neonates. *Psychoneuroendocrinology* 30(6):520-33.
- Lagace DC, Donovan MH, DeCarolis NA, Farnbauch LA, Malhotra S, Berton O, Nestler EJ, Krishnan V, Eisch AJ. 2010. Adult hippocampal neurogenesis is functionally important for stress-induced social avoidance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(9):4436-41.
- Laloux C, Mairesse J, Van Camp G, Giovine A, Branchi I, Bouret S, Morley-Fletcher S, Bergonzelli G, Malagodi M, Gradini R and others. 2012. Anxiety-like behaviour and associated neurochemical and endocrinological alterations in male pups exposed to prenatal stress. *Psychoneuroendocrinology* 37(10):1646-58.
- Lancel M, Müller-Preuss P, Wigger A, Landgraf R, Holsboer F. 2002. The CRH1 receptor antagonist R121919 attenuates stress-elicited sleep disturbances in rats, particularly in those with high innate anxiety. *J Psychiatr Res* 36(4):197-208.
- Landfield PW, Baskin RK, Pitler TA. 1981a. Brain aging correlates: retardation by hormonal-pharmacological treatments. *Science* 214(4520):581-4.
- Landfield PW, Braun LD, Pitler TA, Lindsey JD, Lynch G. 1981b. Hippocampal aging in rats: a morphometric study of multiple variables in semithin sections. *Neurobiol Aging* 2(4):265-75.
- Landfield PW, Waymire JC, Lynch G. 1978. Hippocampal aging and adrenocorticoids: quantitative correlations. *Science* 202(4372):1098-102.

- Landis C. 1996. Altered sleep patterns with the platform method of REM sleep deprivation in rats. *Sleep Res* 25(abstact):469 (Abstract).
- Landis CA, Bergmann BM, Ismail MM, Rechtschaffen A. 1992. Sleep deprivation in the rat: XV. Ambient temperature choice in paradoxical sleep-deprived rats. *Sleep* 15(1):13-20.
- Lariviere WR, Sattar MA, Melzack R. 2006. Inflammation-susceptible Lewis rats show less sensitivity than resistant Fischer rats in the formalin inflammatory pain test and with repeated thermal testing. *J Neurophysiol* 95(5):2889-97.
- Lee SY, Hwang YK, Yun HS, Han JS. 2012. Decreased levels of nuclear glucocorticoid receptor protein in the hippocampus of aged Long-Evans rats with cognitive impairment. *Brain Res* 1478:48-54.
- Leenaars CH, Dematteis M, Joosten RN, Eggels L, Sandberg H, Schirris M, Feenstra MG, Van Someren EJ. 2011. A new automated method for rat sleep deprivation with minimal confounding effects on corticosterone and locomotor activity. *J Neurosci Methods* 196(1):107-17.
- Lehmann J, Feldon J. 2000. Long-term biobehavioral effects of maternal separation in the rat: consistent or confusing? *Rev Neurosci* 11(4):383-408.
- Lehmann J, Pryce CR, Feldon J. 2000. Lack of effect of an early stressful life event on sensorimotor gating in adult rats. *Schizophr Res* 41(2):365-71.
- Lenglos C, Mitra A, Guèvremont G, Timofeeva E. 2013. Sex differences in the effects of chronic stress and food restriction on body weight gain and brain expression of CRF and relaxin-3 in rats. *Genes Brain Behav* 12(4):370-87.
- Leproult R, Copinschi G, Buxton O, Van Cauter E. 1997. Sleep loss results in an elevation of cortisol levels the next evening. *Sleep* 20(10):865-70.
- Leproult R, Van Cauter E. 2010. Role of sleep and sleep loss in hormonal release and metabolism. *Endocr Dev* 17:11-21.
- Leuner B, Caponiti JM, Gould E. 2012. Oxytocin stimulates adult neurogenesis even under conditions of stress and elevated glucocorticoids. *Hippocampus* 22(4):861-8.
- Leuner B, Glasper ER, Gould E. 2010. Sexual experience promotes adult neurogenesis in the hippocampus despite an initial elevation in stress hormones. *PLoS One* 5(7):e11597.
- Leuner B, Gould E. 2010. Structural plasticity and hippocampal function. *Annu Rev Psychol* 61:111-40, C1-3.
- Leuner B, Waddell J, Gould E, Shors TJ. 2006. Temporal discontinuity is neither necessary nor sufficient for learning-induced effects on adult neurogenesis. *J Neurosci* 26(52):13437-42.
- Levine S. 2005. Developmental determinants of sensitivity and resistance to stress. *Psychoneuroendocrinology* 30(10):939-46.
- Levine S, Huchton DM, Wiener SG, Rosenfeld P. 1991. Time course of the effect of maternal deprivation on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat. *Dev Psychobiol* 24(8):547-58.
- Levine S, Mody T. 2003. The long-term psychobiological consequences of intermittent postnatal separation in the squirrel monkey. *Neurosci Biobehav Rev* 27(1-2):83-9.
- Levine S, Ursin H. 1991. What is stress? In: Brown MR, Koob G, Rivier C, editors. *Stress: Neurobiology and Neuroendocrinology*. New York: Marcel Dekker, Inc. p 3-21.
- Liebsch G, Landgraf R, Engelmann M, Lörcher P, Holsboer F. 1999. Differential behavioural effects of chronic infusion of CRH 1 and CRH 2 receptor antisense oligonucleotides into the rat brain. *J Psychiatr Res* 33(2):153-63.

- Liebsch G, Landgraf R, Gerstberger R, Probst JC, Wotjak CT, Engelmann M, Holsboer F, Montkowski A. 1995. Chronic infusion of a CRH1 receptor antisense oligodeoxynucleotide into the central nucleus of the amygdala reduced anxiety-related behavior in socially defeated rats. *Regul Pept* 59(2):229-39.
- Liu D, Caldji C, Sharma S, Plotsky PM, Meaney MJ. 2000. Influence of neonatal rearing conditions on stress-induced adrenocorticotropin responses and norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus. *J Neuroendocrinol* 12(1):5-12.
- Liu X, Tang X, Sanford LD. 2003. Fear-conditioned suppression of REM sleep: relationship to Fos expression patterns in limbic and brainstem regions in BALB/cJ mice. *Brain Res* 991(1-2):1-17.
- Liu X, Tang X, Sanford LD. 2009. Stressor controllability and Fos expression in stress regulatory regions in mice. *Physiol Behav* 97(3-4):321-6.
- Llorente R, Arranz L, Marco EM, Moreno E, Puerto M, Guaza C, De la Fuente M, Viveros MP. 2007. Early maternal deprivation and neonatal single administration with a cannabinoid agonist induce long-term sex-dependent psychoimmunoendocrine effects in adolescent rats. *Psychoneuroendocrinology* 32(6):636-50.
- Lund TD, Munson DJ, Haldy ME, Handa RJ. 2004. Androgen inhibits, while oestrogen enhances, restraint-induced activation of neuropeptide neurones in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 16(3):272-8.
- Lupien SJ, Fiocco A, Wan N, Maheu F, Lord C, Schramek T, Tu MT. 2005. Stress hormones and human memory function across the lifespan. *Psychoneuroendocrinology* 30(3):225-42.
- Lupien SJ, King S, Meaney MJ, McEwen BS. 2000. Child's stress hormone levels correlate with mother's socioeconomic status and depressive state. *Biol Psychiatry* 48(10):976-80.
- Lupien SJ, Maheu F, Tu M, Fiocco A, Schramek TE. 2007. The effects of stress and stress hormones on human cognition: Implications for the field of brain and cognition. *Brain Cogn* 65(3):209-37.
- Lupien SJ, McEwen BS, Gunnar MR, Heim C. 2009. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nat Rev Neurosci* 10(6):434-45.
- Lupien SJ, Wilkinson CW, Brière S, Ng Ying Kin NM, Meaney MJ, Nair NP. 2002. Acute modulation of aged human memory by pharmacological manipulation of glucocorticoids. *J Clin Endocrinol Metab* 87(8):3798-807.
- Luppi PH, Aston-Jones G, Akaoka H, Chouvet G, Jouvet M. 1995. Afferent projections to the rat locus coeruleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing with cholera-toxin B subunit and Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *Neuroscience* 65(1):119-60.
- Luz J, Griggio MA, Vieira LV. 2003. Impact of maternal food restriction on cold-induced thermogenesis in the offspring. *Biol Neonate* 84(3):252-8.
- Lyons DM, Parker KJ. 2007. Stress inoculation-induced indications of resilience in monkeys. *J Trauma Stress* 20(4):423-33.
- Lyons DM, Parker KJ, Katz M, Schatzberg AF. 2009. Developmental cascades linking stress inoculation, arousal regulation, and resilience. *Front Behav Neurosci* 3:32.
- Maccari S, Darnaudery M, Morley-Fletcher S, Zuena AR, Cinque C, Van Reeth O. 2003. Prenatal stress and long-term consequences: implications of glucocorticoid hormones. *Neurosci Biobehav Rev* 27(1-2):119-27.

- Maccari S, Piazza PV, Kabbaj M, Barbazanges A, Simon H, Le Moal M. 1995. Adoption reverses the long-term impairment in glucocorticoid feedback induced by prenatal stress. *J Neurosci* 15(1 Pt 1):110-6.
- Macedo IC, Medeiros LF, Oliveira C, Oliveira CM, Rozisky JR, Scarabelot VL, Souza A, Silva FR, Santos VS, Cioato SG and others. 2012. Cafeteria diet-induced obesity plus chronic stress alter serum leptin levels. *Peptides* 38(1):189-96.
- Machado R, Suchecki D, Tufik S. 2005. Sleep homeostasis in rats assessed by a long-term intermittent paradoxical sleep deprivation protocol. *Behavioural Brain Research* 160(2):356-364.
- Machado RB, Hipolide DC, Benedito-Silva AA, Tufik S. 2004. Sleep deprivation induced by the modified multiple platform technique: quantification of sleep loss and recovery. *Brain Res* 1004(1-2):45-51.
- Machado RB, Tufik S, Suchecki D. 2008. Chronic stress during paradoxical sleep deprivation increases paradoxical sleep rebound: Association with prolactin plasma levels and brain serotonin content. *Psychoneuroendocrinology* 33(9):1211-1224.
- Machado RB, Tufik S, Suchecki D. 2010. Modulation of Sleep Homeostasis by Corticotropin Releasing Hormone in REM Sleep-Deprived Rats. *International Journal of Endocrinology*.
- Machado RB, Tufik S, Suchecki D. 2013. Role of corticosterone on sleep homeostasis induced by REM sleep deprivation in rats. *PLoS One* 8(5):e63520.
- Maggio M, Colizzi E, Fisichella A, Valenti G, Ceresini G, Dall'aglio E, Ruffini L, Lauretani F, Parrino L, Ceda GP. 2013. Stress hormones, sleep deprivation and cognition in older adults. *Maturitas* 76(1):22-44.
- Majumdar S, Mallick BN. 2003. Increased levels of tyrosine hydroxylase and glutamic acid decarboxylase in locus coeruleus neurons after rapid eye movement sleep deprivation in rats. *Neurosci Lett* 338(3):193-6.
- Makara GB, Haller J. 2001. Non-genomic effects of glucocorticoids in the neural system. Evidence, mechanisms and implications. *Prog Neurobiol* 65(4):367-90.
- Mandai O, Guerrien A, Sockeel P, Dujardin K, Leconte P. 1989. REM sleep modifications following a Morse code learning session in humans. *Physiol Behav* 46(4):639-42.
- Marco EM, Adriani W, Llorente R, Laviola G, Viveros MP. 2009. Detrimental psychophysiological effects of early maternal deprivation in adolescent and adult rodents: altered responses to cannabinoid exposure. *Neurosci Biobehav Rev* 33(4):498-507.
- Maren S, Fanselow MS. 1997. Electrolytic lesions of the fimbria/fornix, dorsal hippocampus, or entorhinal cortex produce anterograde deficits in contextual fear conditioning in rats. *Neurobiol Learn Mem* 67(2):142-9.
- Marin MT, Planeta CS. 2004. Maternal separation affects cocaine-induced locomotion and response to novelty in adolescent, but not in adult rats. *Brain Res* 1013(1):83-90.
- Marinesco S, Bonnet C, Cespuglio R. 1999. Influence of stress duration on the sleep rebound induced by immobilization in the rat: a possible role for corticosterone. *Neuroscience* 92(3):921-33.
- Marshall NS, Glozier N, Grunstein RR. 2008. Is sleep duration related to obesity? A critical review of the epidemiological evidence. *Sleep Med Rev* 12(4):289-98.
- Marshall NS, Wong KK, Phillips CL, Liu PY, Knuiam MW, Grunstein RR. 2009. Is sleep apnea an independent risk factor for prevalent and incident diabetes in the Busselton Health Study? *J Clin Sleep Med* 5(1):15-20.

- Martinez-Gonzalez D, Obermeyer W, Fahy JL, Riboh M, Kalin NH, Benca RM. 2004. REM sleep deprivation induces changes in coping responses that are not reversed by amphetamine. *Sleep* 27(4):609-17.
- Martins PJ, D'Almeida V, Nobrega JN, Tufik S. 2006. A reassessment of the hyperphagia/weight-loss paradox during sleep deprivation. *Sleep* 29(9):1233-8.
- Martins PJ, Marques MS, Tufik S, D'Almeida V. 2010. Orexin activation precedes increased NPY expression, hyperphagia, and metabolic changes in response to sleep deprivation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298(3):E726-34.
- Martins PJ, Nobrega JN, Tufik S, D'Almeida V. 2008. Sleep deprivation-induced gnawing-relationship to changes in feeding behavior in rats. *Physiol Behav* 93(1-2):229-34.
- Martí O, Martí J, Armario A. 1994. Effects of chronic stress on food intake in rats: influence of stressor intensity and duration of daily exposure. *Physiol Behav* 55(4):747-53.
- Mason JW. 1968a. A review of psychoendocrine research on the pituitary-adrenal cortical system. *Psychosom Med* 30(5):Suppl:576-607.
- Mason JW. 1968b. A review of psychoendocrine research on the sympathetic-adrenal medullary system. *Psychosom Med* 30(5):Suppl:631-53.
- Mathews IZ, Wilton A, Styles A, McCormick CM. 2008. Increased depressive behaviour in females and heightened corticosterone release in males to swim stress after adolescent social stress in rats. *Behav Brain Res* 190(1):33-40.
- McClelland S, Korosi A, Cope J, Ivy A, Baram TZ. 2011. Emerging roles of epigenetic mechanisms in the enduring effects of early-life stress and experience on learning and memory. *Neurobiol Learn Mem* 96(1):79-88.
- McCormick CM, Mathews IZ. 2007. HPA function in adolescence: role of sex hormones in its regulation and the enduring consequences of exposure to stressors. *Pharmacol Biochem Behav* 86(2):220-33.
- McCormick CM, Robarts D, Kopeikina K, Kelsey JE. 2005. Long-lasting, sex- and age-specific effects of social stressors on corticosterone responses to restraint and on locomotor responses to psychostimulants in rats. *Horm Behav* 48(1):64-74.
- McCormick CM, Smith C, Mathews IZ. 2008. Effects of chronic social stress in adolescence on anxiety and neuroendocrine response to mild stress in male and female rats. *Behav Brain Res* 187(2):228-38.
- McDermott CM, LaHoste GJ, Chen C, Musto A, Bazan NG, Magee JC. 2003. Sleep deprivation causes behavioral, synaptic, and membrane excitability alterations in hippocampal neurons. *J Neurosci* 23(29):9687-95.
- McEwen BS. 1998. Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Ann N Y Acad Sci* 840:33-44.
- McEwen BS. 2000. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res* 886(1-2):172-189.
- McEwen BS. 2006. Protective and damaging effects of stress mediators: central role of the brain. *Dialogues Clin Neurosci* 8(4):367-81.
- McEwen BS, Gianaros PJ. 2010. Central role of the brain in stress and adaptation: links to socioeconomic status, health, and disease. *Ann N Y Acad Sci* 1186:190-222.
- McEwen BS, Lasley EN. 2002. The end of stress as we know it. Washington, D.C.: Joseph Henry Press. 239 p.
- McEwen BS, Weiss JM, Schwartz LS. 1969. Uptake of corticosterone by rat brain and its concentration by certain limbic structures. *Brain Res* 16(1):227-41.
- Meerlo P, Easton A, Bergmann BM, Turek FW. 2001. Restraint increases prolactin and REM sleep in C57BL/6J mice but not in BALB/cJ mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281(3):R846-54.

- Meerlo P, Koehl M, van der Borgh K, Turek FW. 2002. Sleep restriction alters the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress. *J Neuroendocrinol* 14(5):397-402.
- Mendelson WB, Guthrie RD, Frederick G, Wyatt RJ. 1974. The flower pot technique of rapid eye movement (REM) sleep deprivation. *Pharmacol Biochem Behav* 2(4):553-6.
- Merchenthaler I. 1984. Corticotropin releasing factor (CRF)-like immunoreactivity in the rat central nervous system. Extrahypothalamic distribution. *Peptides* 5 Suppl 1:53-69.
- Mistlberger RE, Antle MC, Webb IC, Jones M, Weinberg J, Pollock MS. 2003. Circadian clock resetting by arousal in Syrian hamsters: the role of stress and activity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285(4):R917-25.
- Moffett MC, Vicentic A, Kozel M, Plotsky P, Francis DD, Kuhar MJ. 2007. Maternal separation alters drug intake patterns in adulthood in rats. *Biochem Pharmacol* 73(3):321-30.
- Morden B, Mitchell G, Dement W. 1967. Selective REM sleep deprivation and compensation phenomena in the rat. *Brain Res* 5(3):339-49.
- Moreira KM, Ferreira TL, Hipólido DC, Fornari RV, Tufik S, Oliveira MG. 2010. Modafinil prevents inhibitory avoidance memory deficit induced by sleep deprivation in rats. *Sleep* 33(7):990-3.
- Moreira KM, Hipólido DC, Nobrega JN, Bueno OF, Tufik S, Oliveira MG. 2003. Deficits in avoidance responding after paradoxical sleep deprivation are not associated with altered [3H]pirenzepine binding to M1 muscarinic receptors in rat brain. *Brain Res* 977(1):31-7.
- Morgane PJ, Mokler DJ, Galler JR. 2002. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci Biobehav Rev* 26(4):471-83.
- Morilak DA, Barrera G, Echevarria DJ, Garcia AS, Hernandez A, Ma S, Petre CO. 2005. Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29(8):1214-24.
- Morley-Fletcher S, Darnaudery M, Koehl M, Casolini P, Van Reeth O, Maccari S. 2003. Prenatal stress in rats predicts immobility behavior in the forced swim test. Effects of a chronic treatment with tianeptine. *Brain Res* 989(2):246-51.
- Mormède P, Lemaire V, Castanon N, Dulluc J, Laval M, Le Moal M. 1990. Multiple neuroendocrine responses to chronic social stress: interaction between individual characteristics and situational factors. *Physiol Behav* 47(6):1099-105.
- Motivala SJ, Tomiyama AJ, Ziegler M, Khandrika S, Irwin MR. 2009. Nocturnal levels of ghrelin and leptin and sleep in chronic insomnia. *Psychoneuroendocrinology* 34(4):540-5.
- Mueller AD, Pollock MS, Lieblich SE, Epp JR, Galea LA, Mistlberger RE. 2008. Sleep deprivation can inhibit adult hippocampal neurogenesis independent of adrenal stress hormones. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294(5):R1693-703.
- Munck A, Guyre PM, Holbrook NJ. 1984. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr Rev* 5(1):25-44.
- Murison R, Ursin R, Coover GD, Lien W, Ursin H. 1982. Sleep deprivation procedure produces stomach lesions in rats. *Physiol Behav* 29(4):693-4.
- Nakamura T, Walker AK, Sominsky L, Allen T, Rosengren S, Hodgson DM. 2011. Maternal separation in early life impairs tumor immunity in adulthood in the F344 rat. *Stress* 14(3):335-43.
- Nederhof E, Schmidt MV. 2012. Mismatch or cumulative stress: toward an integrated hypothesis of programming effects. *Physiol Behav* 106(5):691-700.

- Nemeroff CB, Owens MJ, Bissette G, Andorn AC, Stanley M. 1988. Reduced corticotropin releasing factor binding sites in the frontal cortex of suicide victims. *Arch Gen Psychiatry* 45(6):577-9.
- Nemeroff CB, Widerlöv E, Bissette G, Walléus H, Karlsson I, Eklund K, Kilts CD, Loosen PT, Vale W. 1984. Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. *Science* 226(4680):1342-4.
- Nestler EJ, Hyman SE. 2010. Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci* 13(10):1161-9.
- Nishiura C, Noguchi J, Hashimoto H. 2010. Dietary patterns only partially explain the effect of short sleep duration on the incidence of obesity. *Sleep* 33(6):753-7.
- Novati A, Roman V, Cetin T, Hagewoud R, den Boer JA, Luiten PG, Meerlo P. 2008. Chronically restricted sleep leads to depression-like changes in neurotransmitter receptor sensitivity and neuroendocrine stress reactivity in rats. *Sleep* 31(11):1579-85.
- Nunes Junior GP, Tufik S. 1994. Validation of the modified multiple platform method (MPM) of paradoxical sleep deprivation in rats. *Sleep Res* 23:419 (Abstract).
- Obal F, Opp M, Cady AB, Johannsen L, Krueger JM. 1989. Prolactin, vasoactive intestinal peptide, and peptide histidine methionine elicit selective increases in REM sleep in rabbits. *Brain Res* 490(2):292-300.
- Obál F, Garcia-Garcia F, Kacsóh B, Taishi P, Bohnet S, Horseman ND, Krueger JM. 2005. Rapid eye movement sleep is reduced in prolactin-deficient mice. *J Neurosci* 25(44):10282-9.
- Oitzl MS, Workel JO, Fluttert M, Frösch F, De Kloet ER. 2000. Maternal deprivation affects behaviour from youth to senescence: amplification of individual differences in spatial learning and memory in senescent Brown Norway rats. *Eur J Neurosci* 12(10):3771-80.
- Oomen CA, Girardi CE, Cahyadi R, Verbeek EC, Krugers H, Joëls M, Lucassen PJ. 2009. Opposite effects of early maternal deprivation on neurogenesis in male versus female rats. *PLoS One* 4(1):e3675.
- Oomen CA, Mayer JL, de Kloet ER, Joëls M, Lucassen PJ. 2007. Brief treatment with the glucocorticoid receptor antagonist mifepristone normalizes the reduction in neurogenesis after chronic stress. *Eur J Neurosci* 26(12):3395-401.
- Oomen CA, Soeters H, Audureau N, Vermunt L, van Hasselt FN, Manders EM, Joëls M, Lucassen PJ, Krugers H. 2010. Severe early life stress hampers spatial learning and neurogenesis, but improves hippocampal synaptic plasticity and emotional learning under high-stress conditions in adulthood. *J Neurosci* 30(19):6635-45.
- Ota SM, Moreira KM, Suchecki D, Oliveira MGM, Tiba PA. 2013. Lithium prevents REM sleep deprivation-induced impairments on memory consolidation. *Sleep* in press.
- Pace TW, Mletzko TC, Alagbe O, Musselman DL, Nemeroff CB, Miller AH, Heim CM. 2006. Increased stress-induced inflammatory responses in male patients with major depression and increased early life stress. *Am J Psychiatry* 163(9):1630-3.
- Pacák K, Palkovits M. 2001. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr Rev* 22(4):502-48.
- Palchykova S, Crestani F, Meerlo P, Tobler I. 2006a. Sleep deprivation and daily torpor impair object recognition in Djungarian hamsters. *Physiol Behav* 87(1):144-53.
- Palchykova S, Winsky-Sommerer R, Meerlo P, Durr R, Tobler I. 2006b. Sleep deprivation impairs object recognition in mice. *Neurobiol Learn Mem* 85(3):263-71.
- Palma B, Suchecki D, Tufik S. 2000. Differential effects of acute cold and footshock on the sleep of rats. *Brain Research* 861(1):97-104.

- Papakonstantinou E, Ryan DH, Harris RB. 2003. Dietary fish oil does not protect rats exposed to restraint or sleep deprivation stress. *Physiol Behav* 78(4-5):759-65.
- Papp M. 2012. Models of affective illness: chronic mild stress in the rat. *Curr Protoc Pharmacol* Chapter 5:Unit 5.9.
- Parker KJ, Buckmaster CL, Sundlass K, Schatzberg AF, Lyons DM. 2006. Maternal mediation, stress inoculation, and the development of neuroendocrine stress resistance in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(8):3000-5.
- Patchev V, Felszeghy K, Koranyi L. 1991. Neuroendocrine and neurochemical consequences of long-term sleep deprivation in rats: similarities to some features of depression. *Homeost Health Dis* 33(3):97-108.
- Pawluski JL, Brummelte S, Barha CK, Crozier TM, Galea LA. 2009. Effects of steroid hormones on neurogenesis in the hippocampus of the adult female rodent during the estrous cycle, pregnancy, lactation and aging. *Front Neuroendocrinol* 30(3):343-57.
- Pecoraro N, Reyes F, Gomez F, Bhargava A, Dallman MF. 2004. Chronic stress promotes palatable feeding, which reduces signs of stress: feedforward and feedback effects of chronic stress. *Endocrinology* 145(8):3754-62.
- Penev PD. 2012. Update on energy homeostasis and insufficient sleep. *J Clin Endocrinol Metab* 97(6):1792-801.
- Penza KM, Heim C, Nemeroff CB. 2003. Neurobiological effects of childhood abuse: implications for the pathophysiology of depression and anxiety. *Arch Womens Ment Health* 6(1):15-22.
- Pereira M, Ferreira A. 2006. Demanding pups improve maternal behavioral impairments in sensitized and haloperidol-treated lactating female rats. *Behav Brain Res* 175(1):139-48.
- Pham K, Nacher J, Hof PR, McEwen BS. 2003. Repeated restraint stress suppresses neurogenesis and induces biphasic PSA-NCAM expression in the adult rat dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 17(4):879-86.
- Phillips RG, LeDoux JE. 1992. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* 106(2):274-85.
- Piazza PV, Deminière JM, Le Moal M, Simon H. 1989. Factors that predict individual vulnerability to amphetamine self-administration. *Science* 245(4925):1511-3.
- Pinho N, Moreira KM, Hipolide DC, Sinigaglia-Coimbra R, Ferreira TL, Nobrega JN, Tufik S, Oliveira MG. 2013. Sleep deprivation alters phosphorylated CREB levels in the amygdala: relationship with performance in a fear conditioning task. *Behav Brain Res* 236(1):221-4.
- Ploj K, Roman E, Nylander I. 2002. Effects of maternal separation on brain nociceptin/orphanin FQ peptide levels in male Wistar rats. *Pharmacol Biochem Behav* 73(1):123-9.
- Ploj K, Roman E, Nylander I. 2003. Long-term effects of maternal separation on ethanol intake and brain opioid and dopamine receptors in male Wistar rats. *Neuroscience* 121(3):787-99.
- Plotsky PM, Meaney MJ. 1993. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Res Mol Brain Res* 18(3):195-200.
- Plotsky PM, Owens MJ, Nemeroff CB. 1998. Psychoneuroendocrinology of depression. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Psychiatr Clin North Am* 21(2):293-307.

- Plotsky PM, Thrivikraman KV, Nemeroff CB, Caldji C, Sharma S, Meaney MJ. 2005. Long-term consequences of neonatal rearing on central corticotropin-releasing factor systems in adult male rat offspring. *Neuropsychopharmacology* 30(12):2192-204.
- Pokk P, Vali M. 2002. The effects of the nitric oxide synthase inhibitors on the behaviour of small-platform-stressed mice in the plus-maze test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 26(2):241-7.
- Pokk P, Väli M. 2001. Small platform stress increases exploratory activity of mice in staircase test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 25(7):1435-44.
- Porkka-Heiskanen T, Smith SE, Taira T, Urban JH, Levine JE, Turek FW, Stenberg D. 1995. Noradrenergic activity in rat brain during rapid eye movement sleep deprivation and rebound sleep. *Am J Physiol* 268(6 Pt 2):R1456-63.
- Potter E, Sutton S, Donaldson C, Chen R, Perrin M, Lewis K, Sawchenko PE, Vale W. 1994. Distribution of corticotropin-releasing factor receptor mRNA expression in the rat brain and pituitary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(19):8777-81.
- Prete FR, Bergmann BM, Holtzman P, Obermeyer W, Rechtschaffen A. 1991. Sleep deprivation in the rat: XII. Effect on ambient temperature choice. *Sleep* 14(2):109-15.
- Pritchard LE, Turnbull AV, White A. 2002. Pro-opiomelanocortin processing in the hypothalamus: impact on melanocortin signalling and obesity. *J Endocrinol* 172(3):411-21.
- Pryce CR, Bettschen D, Bahr NI, Feldon J. 2001. Comparison of the effects of infant handling, isolation, and nonhandling on acoustic startle, prepulse inhibition, locomotion, and HPA activity in the adult rat. *Behav Neurosci* 115(1):71-83.
- Pugh CR, Tremblay D, Fleshner M, Rudy JW. 1997. A selective role for corticosterone in contextual-fear conditioning. *Behav Neurosci* 111(3):503-11.
- Raadsheer FC, Hoogendijk WJ, Stam FC, Tilders FJ, Swaab DF. 1994. Increased numbers of corticotropin-releasing hormone expressing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of depressed patients. *Neuroendocrinology* 60(4):436-44.
- Radley JJ, Williams B, Sawchenko PE. 2008. Noradrenergic innervation of the dorsal medial prefrontal cortex modulates hypothalamo-pituitary-adrenal responses to acute emotional stress. *J Neurosci* 28(22):5806-16.
- Rama AN, Cho SC, Kushida CA. 2009. Normal human sleep. In: Lee-Chiong TL, editor. *Sleep Medicine Essentials*. New Jersey: Wiley-Blackwell. p 1-4.
- Ravinder S, Pillai AG, Chattarji S. 2011. Cellular correlates of enhanced anxiety caused by acute treatment with the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine in rats. *Front Behav Neurosci* 5:88.
- Rechtschaffen A, Gilliland MA, Bergmann BM, Winter JB. 1983. Physiological correlates of prolonged sleep deprivation in rats. *Science* 221(4606):182-4.
- Renegar KB, Floyd R, Krueger JM. 1998. Effect of sleep deprivation on serum influenza-specific IgG. *Sleep* 21(1):19-24.
- Reul JM, de Kloet ER. 1986. Anatomical resolution of two types of corticosterone receptor sites in rat brain with in vitro autoradiography and computerized image analysis. *J Steroid Biochem* 24(1):269-72.
- Reyes BA, Valentino RJ, Xu G, Van Bockstaele EJ. 2005. Hypothalamic projections to locus coeruleus neurons in rat brain. *Eur J Neurosci* 22(1):93-106.
- Reynolds RM, Hii HL, Pennell CE, McKeague IW, Kloet ER, Lye S, Stanley FJ, Mattes E, Foster JK. 2013. Analysis of baseline hypothalamic-pituitary-adrenal activity in late adolescence reveals gender specific sensitivity of the stress axis. *Psychoneuroendocrinology* 38(8):1271-80.

- Ricart-Jané D, Rodríguez-Sureda V, Benavides A, Peinado-Onsurbe J, López-Tejero MD, Llobera M. 2002. Immobilization stress alters intermediate metabolism and circulating lipoproteins in the rat. *Metabolism* 51(7):925-31.
- Rice CJ, Sandman CA, Lenjavi MR, Baram TZ. 2008. A novel mouse model for acute and long-lasting consequences of early life stress. *Endocrinology* 149(10):4892-900.
- Riemann D, Voderholzer U. 2003. Primary insomnia: a risk factor to develop depression? *J Affect Disord* 76(1-3):255-9.
- Risbrough VB, Stein MB. 2006. Role of corticotropin releasing factor in anxiety disorders: a translational research perspective. *Horm Behav* 50(4):550-61.
- Robinson TE, Berridge KC. 1993. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Brain Res Rev* 18(3):247-91.
- Robinson TE, Berridge KC. 2000. The psychology and neurobiology of addiction: an incentive-sensitization view. *Addiction* 95 Suppl 2:S91-117.
- Roky R, Obál F, Valatx JL, Bredow S, Fang J, Pagano LP, Krueger JM. 1995. Prolactin and rapid eye movement sleep regulation. *Sleep* 18(7):536-42.
- Roman E, Gustafsson L, Berg M, Nylander I. 2006a. Behavioral profiles and stress-induced corticosteroid secretion in male Wistar rats subjected to short and prolonged periods of maternal separation. *Horm Behav* 50(5):736-47.
- Roman E, Gustafsson L, Hyytiä P, Nylander I. 2005a. Short and prolonged periods of maternal separation and voluntary ethanol intake in male and female ethanol-preferring AA and ethanol-avoiding ANA rats. *Alcohol Clin Exp Res* 29(4):591-601.
- Roman E, Nylander I. 2005. The impact of emotional stress early in life on adult voluntary ethanol intake-results of maternal separation in rats. *Stress* 8(3):157-74.
- Roman E, Ploj K, Nylander I. 2004. Maternal separation has no effect on voluntary ethanol intake in female Wistar rats. *Alcohol* 33(1):31-9.
- Roman V, Hagewoud R, Luiten PG, Meerlo P. 2006b. Differential effects of chronic partial sleep deprivation and stress on serotonin-1A and muscarinic acetylcholine receptor sensitivity. *J Sleep Res* 15(4):386-94.
- Roman V, Walstra I, Luiten PG, Meerlo P. 2005b. Too little sleep gradually desensitizes the serotonin 1A receptor system. *Sleep* 28(12):1505-10.
- Romanowski CP, Fenzl T, Flachskamm C, Wurst W, Holsboer F, Deussing JM, Kimura M. 2010. Central deficiency of corticotropin-releasing hormone receptor type 1 (CRH-R1) abolishes effects of CRH on NREM but not on REM sleep in mice. *Sleep* 33(4):427-36.
- Romeo RD, Bellani R, Karatsoreos IN, Chhua N, Vernov M, Conrad CD, McEwen BS. 2006. Stress history and pubertal development interact to shape hypothalamic-pituitary-adrenal axis plasticity. *Endocrinology* 147(4):1664-74.
- Romeo RD, Lee SJ, Chhua N, McPherson CR, McEwen BS. 2004a. Testosterone cannot activate an adult-like stress response in prepubertal male rats. *Neuroendocrinology* 79(3):125-32.
- Romeo RD, Lee SJ, McEwen BS. 2004b. Differential stress reactivity in intact and ovariectomized prepubertal and adult female rats. *Neuroendocrinology* 80(6):387-93.
- Romeo RD, McEwen BS. 2006. Stress and the adolescent brain. *Ann N Y Acad Sci* 1094:202-14.
- Rosa Neto JC, Lira FS, Venancio DP, Cunha CA, Oyama LM, Pimentel GD, Tufik S, Oller do Nascimento CM, Santos RV, de Mello MT. 2010. Sleep deprivation affects inflammatory marker expression in adipose tissue. *Lipids Health Dis* 9:125.

- Rosenbrock H, Koros E, Bloching A, Podhorna J, Borsini F. 2005. Effect of chronic intermittent restraint stress on hippocampal expression of marker proteins for synaptic plasticity and progenitor cell proliferation in rats. *Brain Res* 1040(1-2):55-63.
- Rosenfeld P, Ekstrand J, Olson E, Suchecki D, Levine S. 1993. Maternal regulation of adrenocortical activity in the infant rat - effects of feeding. *Developmental Psychobiology* 26(5):261-277.
- Rosenfeld P, Suchecki D, Levine S. 1992. Multifactorial regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during development. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 16(4):553-568.
- Rosnick CB, Rawson KS, Butters MA, Lenze EJ. 2013. Association of cortisol with neuropsychological assessment in older adults with generalized anxiety disorder. *Aging Ment Health* 17(4):432-40.
- Rots NY, de Jong J, Workel JO, Levine S, Cools AR, De Kloet ER. 1996. Neonatal maternally deprived rats have as adults elevated basal pituitary-adrenal activity and enhanced susceptibility to apomorphine. *J Neuroendocrinol* 8(7):501-6.
- Ruskin DN, Liu C, Dunn KE, Bazan NG, LaHoste GJ. 2004. Sleep deprivation impairs hippocampus-mediated contextual learning but not amygdala-mediated cued learning in rats. *Eur J Neurosci* 19(11):3121-4.
- Sagaspe P, Sanchez-Ortuno M, Charles A, Taillard J, Valtat C, Bioulac B, Philip P. 2006. Effects of sleep deprivation on Color-Word, Emotional, and Specific Stroop interference and on self-reported anxiety. *Brain Cogn* 60(1):76-87.
- Salehi B, Cordero MI, Sandi C. 2010. Learning under stress: the inverted-U-shape function revisited. *Learn Mem* 17(10):522-30.
- Sallanon-Moulin M, Touret M, Didier-Bazes M, Roudier V, Fages C, Tardy M, Jouvet M. 1994. Glutamine synthetase modulation in the brain of rats subjected to deprivation of paradoxical sleep. *Brain Res Mol Brain Res* 22(1-4):113-20.
- Salzmann C, Otis M, Long H, Roberge C, Gallo-Payet N, Walker CD. 2004. Inhibition of steroidogenic response to adrenocorticotropin by leptin: implications for the adrenal response to maternal separation in neonatal rats. *Endocrinology* 145(4):1810-22.
- Sanchez-Alavez M, Conti B, Moroncini G, Criado JR. 2007. Contributions of neuronal prion protein on sleep recovery and stress response following sleep deprivation. *Brain Res* 1158:71-80.
- Sanford LD, Yang L, Wellman LL, Dong E, Tang X. 2008. Mouse strain differences in the effects of corticotropin releasing hormone (CRH) on sleep and wakefulness. *Brain Res* 1190:94-104.
- Sanford LD, Yang L, Wellman LL, Liu X, Tang X. 2010. Differential effects of controllable and uncontrollable footshock stress on sleep in mice. *Sleep* 33(5):621-30.
- Sapolsky RM. 1992. Do glucocorticoid concentrations rise with age in the rat? *Neurobiol Aging* 13(1):171-4.
- Sapolsky RM. 1995. Social subordination as a marker of hypercortisolism. Some unexpected subtleties. *Ann N Y Acad Sci* 771:626-39.
- Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS. 1983. The adrenocortical stress-response in the aged male rat: impairment of recovery from stress. *Exp Gerontol* 18(1):55-64.
- Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS. 1986. The adrenocortical axis in the aged rat: impaired sensitivity to both fast and delayed feedback inhibition. *Neurobiol Aging* 7(5):331-5.

- Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev* 21(1):55-89.
- Sawchenko PE, Li HY, Ericsson A. 2000. Circuits and mechanisms governing hypothalamic responses to stress: a tale of two paradigms. *Prog Brain Res* 122:61-78.
- Scheurink AJ, Ammar AA, Benthem B, van Dijk G, Södersten PA. 1999. Exercise and the regulation of energy intake. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23 Suppl 3:S1-6.
- Schlessinger AR, Cowan WM, Gottlieb DI. 1975. An autoradiographic study of the time of origin and the pattern of granule cell migration in the dentate gyrus of the rat. *J Comp Neurol* 159(2):149-75.
- Schmid SM, Hallschmid M, Jauch-Chara K, Born J, Schultes B. 2008. A single night of sleep deprivation increases ghrelin levels and feelings of hunger in normal-weight healthy men. *J Sleep Res* 17(3):331-4.
- Schmidt MV, Levine S, Alam S, Harbich D, Sterlemann V, Ganea K, de Kloet ER, Holsboer F, Müller MB. 2006. Metabolic signals modulate hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation during maternal separation of the neonatal mouse. *J Neuroendocrinol* 18(11):865-74.
- Schobitz B, Holsboer F, Sutanto W, Gross G, Schonbaum E, de Kloet ER. 1994. Corticosterone modulates interleukin-evoked fever in the rat. *Neuroendocrinology* 59(4):387-95.
- Schoenfeld NM, Leathem JH, Rabii J. 1980. Maturation of adrenal stress responsiveness in the rat. *Neuroendocrinology* 31(2):101-5.
- Schoenfeld TJ, Gould E. 2012. Stress, stress hormones, and adult neurogenesis. *Exp Neurol* 233(1):12-21.
- Schuurman T. 1980. Hormonal correlates of agonistic behavior in adult male rats. *Prog Brain Res* 53:415-20.
- Schwartz MW, Baskin DG, Bukowski TR, Kuijper JL, Foster D, Lasser G, Prunkard DE, Porte D, Woods SC, Seeley RJ and others. 1996. Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice. *Diabetes* 45(4):531-5.
- Seeman TE, Singer B, Wilkinson CW, McEwen B. 2001. Gender differences in age-related changes in HPA axis reactivity. *Psychoneuroendocrinology* 26(3):225-40.
- Seligman ME. 1972. Learned helplessness. *Annu Rev Med* 23:407-12.
- Selvage D. 2012. Roles of the locus coeruleus and adrenergic receptors in brain-mediated hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to intracerebroventricular alcohol. *Alcohol Clin Exp Res* 36(6):1084-90.
- Selye H. 1936. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* 138(3479):32.
- Selye H. 1937. The significance of the adrenals for adaptation. *Science* 85(2201):247-8.
- Selye H. 1950. Stress and the general adaptation syndrome. *Br Med J* 1(4667):1383-92.
- Selye H. 1955. Stress and disease. *Science* 122(3171):625-31.
- Selye H. 1965. The stress syndrome. *American Journal of Nursing* 65(3):97-99.
- Selye H. 1974. Stress without distress. New York: Signet and Mentor Books. 193 p.
- Selye H, Szabo S, Taché Y, Kourounakis P, Mécs I+MECS I, Taché J+TACHE J. 1974. Effect of glucocorticoids upon resistance to various toxicants. *Steroids Lipids Res* 5(1):10-22.
- Sencar-Cupović I, Milković S. 1976. The development of sex differences in the adrenal morphology and responsiveness in stress of rats from birth to the end of life. *Mech Ageing Dev* 5(1):1-9.

- Sgoifo A, Buwalda B, Roos M, Costoli T, Merati G, Meerlo P. 2006. Effects of sleep deprivation on cardiac autonomic and pituitary-adrenocortical stress reactivity in rats. *Psychoneuroendocrinology* 31(2):197-208.
- Silva RH, Kameda SR, Carvalho RC, Takatsu-Coleman AL, Niigaki ST, Abílio VC, Tufik S, Frussa-Filho R. 2004. Anxiogenic effect of sleep deprivation in the elevated plus-maze test in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 176(2):115-22.
- Skelton KH, Gutman DA, Thrivikraman KV, Nemeroff CB, Owens MJ. 2007. The CRF1 receptor antagonist R121919 attenuates the neuroendocrine and behavioral effects of precipitated lorazepam withdrawal. *Psychopharmacology (Berl)* 192(3):385-96.
- Skutella T, Montkowski A, Stöhr T, Probst JC, Landgraf R, Holsboer F, Jirikowski GF. 1994. Corticotropin-releasing hormone (CRH) antisense oligodeoxynucleotide treatment attenuates social defeat-induced anxiety in rats. *Cell Mol Neurobiol* 14(5):579-88.
- Smith C. 1995. Sleep states and memory processes. *Behav Brain Res* 69(1-2):137-45.
- Smith C, Lapp L. 1991. Increases in number of REMS and REM density in humans following an intensive learning period. *Sleep* 14(4):325-30.
- Smith C, Rose GM. 1996. Evidence for a paradoxical sleep window for place learning in the Morris water maze. *Physiol Behav* 59(1):93-7.
- Smith CT, Nixon MR, Nader RS. 2004. Posttraining increases in REM sleep intensity implicate REM sleep in memory processing and provide a biological marker of learning potential. *Learn Mem* 11(6):714-9.
- Smith GW, Aubry JM, Dellu F, Contarino A, Bilezikjian LM, Gold LH, Chen R, Marchuk Y, Hauser C, Bentley CA and others. 1998. Corticotropin releasing factor receptor 1-deficient mice display decreased anxiety, impaired stress response, and aberrant neuroendocrine development. *Neuron* 20(6):1093-102.
- Smith MA, Kim SY, van Oers HJ, Levine S. 1997. Maternal deprivation and stress induce immediate early genes in the infant rat brain. *Endocrinology* 138(11):4622-8.
- Spiegel K, Leproult R, Van Cauter E. 1999. Impact of sleep debt on metabolic and endocrine function. *Lancet* 354(9188):1435-9.
- Spiegel K, Tasali E, Penev P, Van Cauter E. 2004. Brief communication: Sleep curtailment in healthy young men is associated with decreased leptin levels, elevated ghrelin levels, and increased hunger and appetite. *Ann Intern Med* 141(11):846-50.
- Spieß J, Rivier J, Rivier C, Vale W. 1981. Primary structure of corticotropin-releasing factor from ovine hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(10):6517-21.
- Springer KW, Sheridan J, Kuo D, Carnes M. 2007. Long-term physical and mental health consequences of childhood physical abuse: results from a large population-based sample of men and women. *Child Abuse Negl* 31(5):517-30.
- Stanton ME, Wallstrom J, Levine S. 1987. Maternal contact inhibits pituitary-adrenal stress responses in preweanling rats. *Dev Psychobiol* 20(2):131-45.
- Steckler T, Holsboer F. 1999. Corticotropin-releasing hormone receptor subtypes and emotion. *Biol Psychiatry* 46(11):1480-508.
- Stein EJ, da Silveira Filho NG, Machado DC, Hipólido DC, Barlow K, Nobrega JN. 2009. Chronic mild stress induces widespread decreases in thyroid hormone alpha1 receptor mRNA levels in brain--reversal by imipramine. *Psychoneuroendocrinology* 34(2):281-6.
- Stephan M, Straub RH, Breivik T, Pabst R, von Hörsten S. 2002. Postnatal maternal deprivation aggravates experimental autoimmune encephalomyelitis in adult

- Lewis rats: reversal by chronic imipramine treatment. *Int J Dev Neurosci* 20(2):125-32.
- Sterling P. 2012. Allostasis: a model of predictive regulation. *Physiol Behav* 106(1):5-15.
- Suchecki D, Antunes J, Tufik S. 2003. Palatable solutions during paradoxical sleep deprivation: Reduction of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and lack of effect on energy imbalance. *Journal of Neuroendocrinology* 15(9):815-821.
- Suchecki D, Duarte Palma B, Tufik S. 2000a. Sleep rebound in animals deprived of paradoxical sleep by the modified multiple platform method. *Brain Res* 875(1-2):14-22.
- Suchecki D, Lobo L, Hipolide D, Tufik S. 1998. Increased ACTH and corticosterone secretion induced by different methods of paradoxical sleep deprivation. *Journal of Sleep Research* 7(4):276-281.
- Suchecki D, Mozaffarian D, Gross G, Rosenfeld P, Levine S. 1993a. Effects of maternal deprivation on the ACTH stress response in the infant rat. *Neuroendocrinology* 57(2):204-12.
- Suchecki D, Nelson DY, van Oers HJ, Levine S. 1995. Activation and inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of the neonatal rat - effects of maternal deprivation. *Psychoneuroendocrinology* 20(2):169-182.
- Suchecki D, Palermo-Neto J. 1991. Prenatal stress and emotional response of the adult offspring. *Physiology & Behavior* 49(3):423-426.
- Suchecki D, Palma B, Tufik S. 2000b. Pituitary-adrenal axis and behavioural responses of maternally deprived juvenile rats to the open field. *Behavioural Brain Research* 111(1-2):99-106.
- Suchecki D, Rosenfeld P, Levine S. 1993b. Maternal regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat: the roles of feeding and stroking. *Brain Res Dev Brain Res* 75(2):185-92.
- Suchecki D, Tiba P, Tufik S. 2002a. Hormonal and behavioural responses of paradoxical sleep-deprived rats to the elevated plus maze. *Journal of Neuroendocrinology* 14(7):549-554.
- Suchecki D, Tiba P, Tufik S. 2002b. Paradoxical sleep deprivation facilitates subsequent corticosterone response to a mild stressor in rats. *Neuroscience Letters* 320(1-2):45-48.
- Suchecki D, Tufik S. 1997. Long-term effects of maternal deprivation on the corticosterone response to stress in rats. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 273(4):R1332-R1338.
- Suchecki D, Tufik S. 2000. Social stability attenuates the stress in the modified multiple platform method for paradoxical sleep deprivation in the rat. *Physiology & Behavior* 68(3):309-316.
- Suchecki D, Tufik S. 2011. Comparison of REM sleep-deprivation methods: Role of stress and validity of use. In: Mallick BN, Pandi-Perumal SR, McCarley RW, Morrison AR, editors. *Rapid Eye Movement Sleep: Regulation and Function*. New York: Cambridge University Press. p 368-382.
- Sutton RE, Koob GF, Le Moal M, Rivier J, Vale W. 1982. Corticotropin releasing factor produces behavioural activation in rats. *Nature* 297(5864):331-3.
- Svensson TH. 1987. Stress, central neurotransmitters, and the mechanism of action of alpha 2-adrenoceptor agonists. *J Cardiovasc Pharmacol* 10 Suppl 12:S88-92.
- Swanson LW, Sawchenko PE. 1980. Paraventricular nucleus: a site for the integration of neuroendocrine and autonomic mechanisms. *Neuroendocrinology* 31(6):410-7.

- Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, Vale WW. 1983. Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology* 36(3):165-86.
- Szabó ER, Cservenák M, Dobolyi A. 2012. Amylin is a novel neuropeptide with potential maternal functions in the rat. *FASEB J* 26(1):272-81.
- Tamashiro KL, Hegeman MA, Nguyen MM, Melhorn SJ, Ma LY, Woods SC, Sakai RR. 2007. Dynamic body weight and body composition changes in response to subordination stress. *Physiol Behav* 91(4):440-8.
- Tamashiro KL, Hegeman MA, Sakai RR. 2006. Chronic social stress in a changing dietary environment. *Physiol Behav* 89(4):536-42.
- Tanapat P, Hastings NB, Reeves AJ, Gould E. 1999. Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *J Neurosci* 19(14):5792-801.
- Tanapat P, Hastings NB, Rydel TA, Galea LA, Gould E. 2001. Exposure to fox odor inhibits cell proliferation in the hippocampus of adult rats via an adrenal hormone-dependent mechanism. *J Comp Neurol* 437(4):496-504.
- Tanti A, Belzung C. 2013. Neurogenesis along the septo-temporal axis of the hippocampus: Are depression and the action of antidepressants region-specific? *Neuroscience* 252C:234-252.
- Tartar JL, Ward CP, Cordeira JW, Legare SL, Blanchette AJ, McCarley RW, Strecker RE. 2009. Experimental sleep fragmentation and sleep deprivation in rats increases exploration in an open field test of anxiety while increasing plasma corticosterone levels. *Behav Brain Res* 197(2):450-3.
- Tiba PA, Oliveira MG, Rossi VC, Tufik S, Suchecki D. 2008a. Glucocorticoids are not responsible for paradoxical sleep deprivation-induced memory impairments. *Sleep* 31(4):505-15.
- Tiba PA, Tufik S, Suchecki D. 2004. Effects of maternal separation on baseline sleep and cold stress-induced sleep rebound in adult Wistar rats. *Sleep* 27(6):1146-53.
- Tiba PA, Tufik S, Suchecki D. 2008b. Long lasting alteration in REM sleep of female rats submitted to long maternal separation. *Physiology & Behavior* 93(3):444-452.
- Timpl P, Spanagel R, Sillaber I, Kresse A, Reul JM, Stalla GK, Blanquet V, Steckler T, Holsboer F, Wurst W. 1998. Impaired stress response and reduced anxiety in mice lacking a functional corticotropin-releasing hormone receptor 1. *Nat Genet* 19(2):162-6.
- Tirelli E, Laviola G, Adriani W. 2003. Ontogenesis of behavioral sensitization and conditioned place preference induced by psychostimulants in laboratory rodents. *Neurosci Biobehav Rev* 27(1-2):163-78.
- Tobler I, Jaggi K. 1987. Sleep and EEG spectra in the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) under baseline conditions and following sleep deprivation. *J Comp Physiol A* 161(3):449-59.
- Tobler I, Murison R, Ursin R, Ursin H, Borbely AA. 1983. The effect of sleep deprivation and recovery sleep on plasma corticosterone in the rat. *Neurosci Lett* 35(3):297-300.
- Toth LA, Opp MR, Mao L. 1995. Somnogenic effects of sleep deprivation and *Escherichia coli* inoculation in rabbits. *J Sleep Res* 4(1):30-40.
- Touma C, Fenzl T, Ruschel J, Palme R, Holsboer F, Kimura M, Landgraf R. 2009. Rhythmicity in mice selected for extremes in stress reactivity: behavioural, endocrine and sleep changes resembling endophenotypes of major depression. *PLoS One* 4(1):e4325.

- Trachsel L, Tobler I, Achermann P, Borbely AA. 1991. Sleep continuity and the REM-nonREM cycle in the rat under baseline conditions and after sleep deprivation. *Physiol Behav* 49(3):575-80.
- Tufik S, de Luca Nathan C, Neumann B, Hipolide DC, Lobo LL, de Medeiros R, Troncone LR, Braz S, Suchecki D. 1995. Effects of stress on drug-induced yawning: constant vs. intermittent stress. *Physiol Behav* 58(1):181-4.
- Tufik S, Lindsey CJ, Carlini EA. 1978. Does REM sleep deprivation induce a supersensitivity of dopaminergic receptors in the rat brain? *Pharmacology* 16(2):98-105.
- Tyrka AR, Walters OC, Price LH, Anderson GM, Carpenter LL. 2012. Altered response to neuroendocrine challenge linked to indices of the metabolic syndrome in healthy adults. *Horm Metab Res* 44(7):543-9.
- Tyrka AR, Wier L, Price LH, Ross N, Anderson GM, Wilkinson CW, Carpenter LL. 2008. Childhood parental loss and adult hypothalamic-pituitary-adrenal function. *Biol Psychiatry* 63(12):1147-54.
- Uhart M, Chong RY, Oswald L, Lin PI, Wand GS. 2006. Gender differences in hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis reactivity. *Psychoneuroendocrinology* 31(5):642-52.
- Ulrich-Lai YM, Figueiredo HF, Ostrander MM, Choi DC, Engeland WC, Herman JP. 2006. Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291(5):E965-73.
- Ulrich-Lai YM, Herman JP. 2009. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci* 10(6):397-409.
- Ulrich-Lai YM, Ostrander MM, Thomas IM, Packard BA, Furay AR, Dolgas CM, Van Hooren DC, Figueiredo HF, Mueller NK, Choi DC and others. 2007. Daily limited access to sweetened drink attenuates hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis stress responses. *Endocrinology* 148(4):1823-34.
- Ursin H, Eriksen HR. 2004. The cognitive activation theory of stress. *Psychoneuroendocrinology* 29(5):567-92.
- Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J. 1981. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* 213(4514):1394-7.
- Vallée M, Mayo W, Dellu F, Le Moal M, Simon H, Maccari S. 1997. Prenatal stress induces high anxiety and postnatal handling induces low anxiety in adult offspring: correlation with stress-induced corticosterone secretion. *J Neurosci* 17(7):2626-36.
- Van Cauter E, Leproult R, Plat L. 2000. Age-related changes in slow wave sleep and REM sleep and relationship with growth hormone and cortisol levels in healthy men. *JAMA* 284(7):861-8.
- van Cauter E, Turek FW. 2001. Roles of sleep-wake and dark-light cycles in the control of endocrine, metabolic, cardiovascular, and cognitive function. In: McEwen BS, editor. *Coping with the environment: neural and endocrine mechanisms*. New York: Oxford University Press, Inc. p 313-330.
- van Eekelen JAM, Rots NY, Sutanto W, De Kloet ER. 1991. The effect of aging on stress responsiveness and central corticosteroid receptors in the Brown Norway rat. *Neurobiology of Aging* 13:150-170.
- van Hulzen ZJ, Coenen AM. 1981. Paradoxical sleep deprivation and locomotor activity in rats. *Physiol Behav* 27(4):741-4.
- van Oers HJ, de Kloet ER, Levine S. 1997. Persistent, but Paradoxical, Effects on HPA Regulation of Infants Maternally Deprived at Different Ages. *Stress* 1(4):249-262.

- van Oers HJ, de Kloet ER, Levine S. 1998a. Early vs. late maternal deprivation differentially alters the endocrine and hypothalamic responses to stress. *Brain Res Dev Brain Res* 111(2):245-52.
- van Oers HJ, de Kloet ER, Li C, Levine S. 1998b. The ontogeny of glucocorticoid negative feedback: influence of maternal deprivation. *Endocrinology* 139(6):2838-46.
- van Oers HJ, de Kloet ER, Whelan T, Levine S. 1998c. Maternal deprivation effect on the infant's neural stress markers is reversed by tactile stimulation and feeding but not by suppressing corticosterone. *J Neurosci* 18(23):10171-9.
- van Os J, Selten JP. 1998. Prenatal exposure to maternal stress and subsequent schizophrenia. The May 1940 invasion of The Netherlands. *Br J Psychiatry* 172:324-6.
- van Praag H, Kempermann G, Gage FH. 1999. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 2(3):266-70.
- Vazquez V, Penit-Soria J, Durand C, Besson MJ, Giros B, Daugé V. 2005. Maternal deprivation increases vulnerability to morphine dependence and disturbs the enkephalinergic system in adulthood. *J Neurosci* 25(18):4453-62.
- Vega-Rivera NM, Fernández-Guasti A, Ramírez-Rodríguez G, Estrada-Camarena E. 2013. Acute stress further decreases the effect of ovariectomy on immobility behavior and hippocampal cell survival in rats. *Psychoneuroendocrinology* 38(8):1407-17.
- Verma P, Hellemans KG, Choi FY, Yu W, Weinberg J. 2010. Circadian phase and sex effects on depressive/anxiety-like behaviors and HPA axis responses to acute stress. *Physiol Behav* 99(3):276-85.
- Vgontzas AN, Bixler EO, Lin HM, Prolo P, Mastorakos G, Vela-Bueno A, Kales A, Chrousos GP. 2001. Chronic insomnia is associated with nyctohemeral activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab* 86(8):3787-94.
- Vgontzas AN, Tsigos C, Bixler EO, Stratakis CA, Zachman K, Kales A, Vela-Bueno A, Chrousos GP. 1998. Chronic insomnia and activity of the stress system: a preliminary study. *J Psychosom Res* 45(1 Spec No):21-31.
- Viau V, Bingham B, Davis J, Lee P, Wong M. 2005. Gender and puberty interact on the stress-induced activation of parvocellular neurosecretory neurons and corticotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid expression in the rat. *Endocrinology* 146(1):137-46.
- Viau V, Meaney MJ. 1991. Variations in the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress during the estrous cycle in the rat. *Endocrinology* 129(5):2503-11.
- Viau V, Sharma S, Meaney MJ. 1996. Changes in plasma adrenocorticotropin, corticosterone, corticosteroid-binding globulin, and hippocampal glucocorticoid receptor occupancy/translocation in rat pups in response to stress. *J Neuroendocrinol* 8(1):1-8.
- Vig R, Gordon JR, Thébaud B, Befus AD, Vliagoftis H. 2010. The effect of early-life stress on airway inflammation in adult mice. *Neuroimmunomodulation* 17(4):229-39.
- Violanti JM, Burchfiel CM, Hartley TA, Mnatsakanova A, Fekedulegn D, Andrew ME, Charles LE, Vila BJ. 2009. Atypical work hours and metabolic syndrome among police officers. *Arch Environ Occup Health* 64(3):194-201.
- Vogel GW. 1993. Selective REM sleep deprivation. In: Carskadon MA, editor. *Encyclopedia of Sleep and Dreaming*. New York: Macmillan Publishing Company. p 178-180.
- Vythilingam M, Heim C, Newport J, Miller AH, Anderson E, Bronen R, Brummer M, Staib L, Vermetten E, Charney DS and others. 2002. Childhood trauma associated with

- smaller hippocampal volume in women with major depression. *Am J Psychiatry* 159(12):2072-80.
- Vázquez DM, Akil H. 1993. Pituitary-adrenal response to ether vapor in the weanling animal: characterization of the inhibitory effect of glucocorticoids on adrenocorticotropin secretion. *Pediatr Res* 34(5):646-53.
- Wada T, Sei H, Kusumoto K, Kitaoka K, Chikahisa S, Rokutan K, Morita Y. 2006. Geranylgeranylacetone, an inducer of HSP 70, attenuates REM sleep rebound after sleep deprivation. *Brain Res Bull* 69(4):388-92.
- Wagner HR, Hall TL, Cote IL. 1977. The applicability of inescapable shock as a source of animal depression. *J Gen Psychol* 96(2d Half):313-8.
- Walker CD, Akana SF, Cascio CS, Dallman MF. 1990. Adrenalectomy in the neonate: adult-like adrenocortical system responses to both removal and replacement of corticosterone. *Endocrinology* 127(2):832-42.
- Walker CD, Perrin M, Vale W, Rivier C. 1986. Ontogeny of the stress response in the rat: role of the pituitary and the hypothalamus. *Endocrinology* 118(4):1445-51.
- Walker CD, Akana SF, Cascio CS, Dallman MF. 1990. Adrenalectomy in the neonate: adult-like adrenocortical system responses to both removal and replacement of corticosterone. *Endocrinology* 127(2):832-42.
- Walker CD, Scribner KA, Cascio CS, Dallman MF. 1991. The pituitary-adrenocortical system of neonatal rats is responsive to stress throughout development in a time-dependent and stressor-specific fashion. *Endocrinology* 128(3):1385-95.
- Walker JJ, Terry JR, Lightman SL. 2010. Origin of ultradian pulsatility in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Proc Biol Sci* 277(1688):1627-33.
- Walker MP. 2008. Cognitive consequences of sleep and sleep loss. *Sleep Med* 9 Suppl 1:S29-34.
- Walker MP, Stickgold R. 2004. Sleep-dependent learning and memory consolidation. *Neuron* 44(1):121-33.
- Walker MP, van der Helm E. 2009. Overnight therapy? The role of sleep in emotional brain processing. *Psychol Bull* 135(5):731-48.
- Ward IL. 1972. Prenatal stress feminizes and demasculinizes the behavior of males. *Science* 175(4017):82-4.
- Weinstock M. 2001. Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behaviour of the offspring. *Prog Neurobiol* 65(5):427-51.
- Weiss IC, Domeney AM, Heidbreder CA, Moreau JL, Feldon J. 2001. Early social isolation, but not maternal separation, affects behavioral sensitization to amphetamine in male and female adult rats. *Pharmacol Biochem Behav* 70(2-3):397-409.
- Weiss JM. 1970. Somatic effects of predictable and unpredictable shock. *Psychosom Med* 32(4):397-408.
- Weitzman ED, Fukushima D, Nogeire C, Roffwarg H, Gallagher TF, Hellman L. 1971. Twenty-four hour pattern of the episodic secretion of cortisol in normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 33(1):14-22.
- Westenbroek C, Den Boer JA, Veenhuis M, Ter Horst GJ. 2004. Chronic stress and social housing differentially affect neurogenesis in male and female rats. *Brain Res Bull* 64(4):303-8.
- Wetzel W, Wagner T, Balschun D. 2003. REM sleep enhancement induced by different procedures improves memory retention in rats. *Eur J Neurosci* 18(9):2611-7.
- Wieggers GJ, Croiset G, Reul JM, Holsboer F, de Kloet ER. 1993. Differential effects of corticosteroids on rat peripheral blood T-lymphocyte mitogenesis in vivo and in vitro. *Am J Physiol* 265(6 Pt 1):E825-30.

- Windle RJ, Wood SA, Shanks N, Lightman SL, Ingram CD. 1998. Ultradian rhythm of basal corticosterone release in the female rat: dynamic interaction with the response to acute stress. *Endocrinology* 139(2):443-50.
- Workel JO, Oitzl MS, Fluttert M, Lesscher H, Karssen A, de Kloet ER. 2001. Differential and age-dependent effects of maternal deprivation on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of brown norway rats from youth to senescence. *J Neuroendocrinol* 13(7):569-80.
- Yaggi HK, Araujo AB, McKinlay JB. 2006. Sleep duration as a risk factor for the development of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 29(3):657-61.
- Yang L, Wellman LL, Ambrozewicz MA, Sanford LD. 2011. Effects of stressor predictability and controllability on sleep, temperature, and fear behavior in mice. *Sleep* 34(6):759-71.
- Yasuda N, Takebe K, Greer MA. 1976. Evidence of nycterohemeral periodicity in stress-induced pituitary-adrenal activation. *Neuroendocrinology* 21(3):214-24.
- Young EA, Abelson J, Lightman SL. 2004. Cortisol pulsatility and its role in stress regulation and health. *Front Neuroendocrinol* 25(2):69-76.
- Zeugmann S, Quante A, Popova-Zeugmann L, Kössler W, Heuser I, Anghelescu I. 2012. Pathways linking early life stress, metabolic syndrome, and the inflammatory marker fibrinogen in depressed inpatients. *Psychiatr Danub* 24(1):57-65.
- Ziegler DR, Cass WA, Herman JP. 1999. Excitatory influence of the locus coeruleus in hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis responses to stress. *J Neuroendocrinol* 11(5):361-9.
- Zimmerberg B, Rosenthal AJ, Stark AC. 2003. Neonatal social isolation alters both maternal and pup behaviors in rats. *Dev Psychobiol* 42(1):52-63.